

**EINFLUß VON HUMAN- UND SCHWEINEINSULIN
AUF THROMBOZYTENAGGREGATION UND GLYKOSYLIERTES
ALBUMIN BEI DIABETES MELLITUS**

Tilman Bock

Disbui. München

1988



Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr.med. E. Buchborn

Einfluß von Human- und Schweineinsulin auf
Thrombozytenaggregation und Glykosyliertes Albumin
bei Diabetes Mellitus

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Tilman Bock

aus

Nürnberg

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

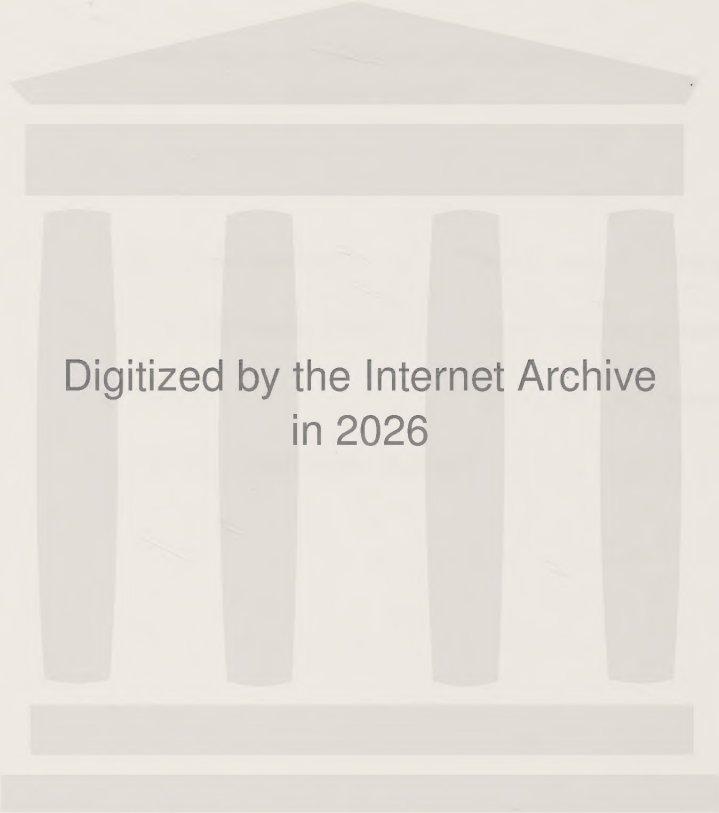
Berichterstatter: Prof. Dr. R. Landgraf

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.2 1988

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus	1
1.2	Humaninsulin	2
1.3	Proteinglykosylierung bei Diabetes mell.	3
1.4	Glykosylierungsreaktion und Mikro- angiopathie	4
1.5	Chemie der Glykosylierung von Proteinen	5
1.6	Thrombozytenaggregation in vivo und in vitro	6
1.7	Ziel der Arbeit	8
2.	Thrombozytenaggregation	9
2.1	Reagenzien	9
2.1.1	Puffer	9
2.1.1.1	Tris-Puffer	9
2.1.1.2	Krebs-Henseleit-Puffer	9
2.1.1.3	Phosphatpuffer	10
2.1.2	ADP	10
2.1.3	Kollagen	10
2.1.4	Arachidonsäure	10
2.2	Methodik	11
2.2.1	Blutabnahme	11
2.2.2	Thrombozytenaufbereitung	11
2.2.2.1	Thrombozytenreiches Plasma (Platelet- rich-plasma, PRP ₁)	11
2.2.2.2	Thrombozytenreiches Plasma (Platelet- poor-plasma, PPP)	12
2.2.2.3	Standardisiertes Plasma (PRP ₂)	12
2.2.3	Aggregometer-Schreiber-Einheit	13
2.2.4	Durchführung der Aggregation	14
2.2.4.1	ADP-induzierte Aggregation bei Normalpersonen	14

2.2.4.2	Kollagen-induzierte Aggregation bei Normalpersonen	15
2.2.4.3	Arachidonsäure-induzierte Aggregation bei Normalpersonen	16
2.3	Statistische Auswertung	18
2.4	Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von verschiedenen Faktoren	18
2.4.1	Zeitabhängigkeit	19
2.4.2	Temperaturabhängigkeit	21
2.4.3	Abhängigkeit von der Thrombozytenzahl	23
2.4.4	Einfluß der Blutentnahmetechnik	24
2.4.5	Zentrifugenvergleich	25
2.4.6	Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von der Aggregantienkonzentration	26
2.4.7	Aggregation in nüchternem und nicht-nüchternem Zustand	30
2.5	Qualitätskontrolle	31
3.	Glykosylierte Proteine	32
3.1	Probensammlung	32
3.2	Bestimmung des glykosylierten Albumins	32
3.2.1	Prinzip der Methode	32
3.2.2	Affinitätschromatographische Trennung des Albumins mit "Affi Gel Blue"	33
3.2.3	Konzentrierung des Chromatographieeluats	33
3.2.4	Säurehydrolyse und Messung von 5-HMF	34
3.3	Abhängigkeit der GSA-Bestimmung von verschiedenen Faktoren	35
3.3.1	Kontrolle der Albuminwiederfindung nach Affinitätschromatographie mittels 51 Cr-Albumin	35
3.3.2	Einfluß des pH der Elutionspuffer auf die Albuminwiederfindung nach Affinitätschromatographie	35

3.3.3	Einfluß der NaCl-Konzentration des Elutionspuffers auf die Albuminwieder- findung	36
3.3.4	Abhängigkeit der 5-HMF-Bildung von der Proteinkonzentration	36
3.4	Fließschema zur Bestimmung des glykosylierten Albumins	37
3.5	Bestimmung der glykosylierten Serumproteine	39
3.6	Weitere Labormethoden	39
3.6.1	Glykosyliertes Hämoglobin (HbA ₁)	39
3.6.2	Serumzucker	40
3.6.3	Serumelektrophorese	40
3.6.4	Serumproteinbestimmung	40
3.7	Korrelationsberechnungen	41
4.	Cross - over - Studie	49
4.1	Versuchsanordnung und Patienten	49
4.1.1	Patientenkollektiv	49
4.1.2	Kontrollpersonen	50
4.1.3	Versuchsablauf	51
4.2	Vergleich der Stoffwechselfparameter zwischen den einzelnen Versuchstagen	52
4.2.1	Alle Diabetiker	52
4.2.2	Alle Normalpersonen	53
4.2.3	Vergleich der Stoffwechselfparameter zwischen Diabetikern und Normalpersonen	54
4.2.4	Weitere Laborparameter	55
4.3	Das Verhalten der Stoffwechselfparameter unter Humaninsulin und Schweineinsulin	56
4.3.1	HbA ₁	56
4.3.2	Glykosyliertes Albumin	57
4.3.3	Mittlere Tagesblutglukose, Nüchtern- blutglukose und Mage	58
4.4	Thrombozytenaggregation	59

4.4.1	Diabetiker	59
4.4.2	Normalpersonen	60
4.4.3	Einfluß der Therapie mit verschiedenen Insulinen auf die Thrombozytenaggregation	61
4.4.4	Thrombozytenaggregation unter der Therapie mit verschiedenen Humaninsulinen und Schweineinsulin im Vergleich mit Normal- personen	62
4.4.5	Arachidonsäure induzierte Aggregation bei Normalpersonen und Diabetikern	64
5.	Diskussion	66
5.1	Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von verschiedenen Faktoren	66
5.2	Glykosyliertes Albumin	69
5.3	Einfluß von Humaninsulin und Schweineinsulin auf die Thrombozytenaggregation	70
6.	Zusammenfassung	72
	Literaturverzeichnis	74

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist heute eine der häufigsten Stoffwechselkrankheiten der Welt. Er ist eine erbliche, chronische Stoffwechselkrankheit, die auf einem relativen oder absoluten Insulinmangel beruht. In Deutschland sind gegenwärtig 2 - 3 % der Bevölkerung manifeste Diabetiker, wobei etwa 10 % Typ I-Diabetiker sind

Starben um die Jahrhundertwende noch 63,8 % aller Diabetiker im Koma und betrug die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung gerade im Durchschnitt 4,9 Jahre, so erliegen nach Entdeckung der Insulintherapie 1922 durch BANTING und BEST heute nur noch 1,1 % der diabetischen Patienten einem Koma [95]. Durch die erzielte Lebensverlängerung rückten die Spätkomplikationen stark in den Vordergrund. Nephropathie, generalisierte Mikroangiopathien und Arteriosklerose bestimmen nun das Schicksal der Diabetiker. Von den Patienten der Bostoner Joslin Klinik starben zwischen 1960 und 1968 76,6 % an den Folgen von Mikro- und Makroangiopathia diabetika. Zeigen die arteriosklerotischen Veränderungen der Makroangiopathia diabetika einen weitgehend eigengesetzlichen Verlauf, der nur mit der Dauer, jedoch nicht mit der Schwere des Diabetes korreliert [57, 88], so scheint die Entwicklung und Progredienz der Mikroangiopathie entscheidend durch die Qualität der Stoffwechselführung beeinflussbar zu sein [24, 35, 72, 94, 95, 115].

Insbesondere länger anhaltende Hyperglykämien scheinen als Hauptfaktor für die Spätkomplikationen verantwortlich zu sein [18, 62, 107, 110].

Zunehmend wird auch eine veränderte Thrombozytenfunktion bei diabetischen Patienten diskutiert [17, 85], die vielleicht durch vermehrt glykosylierte Proteine der Plättchen verursacht wird.

Auf diese beiden Gesichtspunkte sowie das neu entwickelte Humaninsulin soll in folgenden Kapiteln näher eingegangen werden.

1.2 Humaninsulin

Verschiedene Faktoren tragen zu der schnellen Zunahme der insulinbedürftigen diabetischen Bevölkerung bei, wie verbesserte Nachweismethoden, verbesserte Behandlung und steigende Zahl der Anlageträger. Somit ist ein Engpaß in der Versorgung mit tierischem Insulin abzusehen, der zur Suche nach Alternativen der Hormongewinnung zur Substitutionstherapie führte.

Im September 1978 gelang Eli Lilly und Company und Genetech Inc., die erfolgreiche Synthese eines Gens zur Erzeugung von Humaninsulin.

Das Verfahren für die Insulinproduktion zieht Nutzen aus einem speziellen Aspekt der Biochemie des Insulinmoleküls. Die A- und B-Ketten von Insulin sind durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Diese Bindungen können chemisch gespalten und dann wiederhergestellt werden, um ein biologisch aktives Molekül zu bilden. Aufgrund dieser Tatsache entschloß man sich, die A- und B-Ketten von Insulin in getrennten bakteriellen Kulturen herzustellen [42].

Ringförmige DNA-Moleküle sog. Plasmide, die die getrennten A- und B-Ketten codierten, wurden hergestellt und in E. coli K 12-Bakterien eingesetzt. Damit später die Trennung des gewünschten Insulinproteins und des E. coli Proteins möglich ist, wird zwischen Wirts- und Spender DNA ein Codon für Methionin eingebaut [60]. Das chimäre Protein kann dann an der Methioninstelle chemisch gespalten werden. A- und B-Kette wurden nun in getrennten bakteriellen Kulturen hergestellt als sog. Chimären. Nach o.a. Trennung und Reinigung mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatogra-

phie konnte am Ende durch chemische Verknüpfung der A- und B-Ketten biologisch aktives Humaninsulin gewonnen werden [28].

Ob nun dieses neue Humaninsulin Vorteile oder Nachteile im Hinblick auf die Stoffwechseleinstellung und verschiedene Blutlaborparameter zeigt, soll eine in dieser Arbeit beschriebene Cross-Over-Studie zeigen, die mit 8 Diabetikern im Vergleich zu 8 Normalpersonen durchgeführt wurde.

1.3 Proteinglykosylierung bei Diabetes mellitus

Durch die Beobachtung von HUISMANN und DOZY 1962 an vier Diabetikern [53], daß ein bestimmter Typ schnellwandernder Hämoglobine (HbA_1) in 2 - 3fach erhöhter Konzentration gemessen werden konnte, eröffnete sich die Möglichkeit der Blutzuckerkontrolle über längere Perioden hinweg.

HOLMQUIST und SCHRÖDER konnten 1966 zeigen [52], daß HbA_{1c} , die größere Gruppe der "minor hemoglobins", dem HbA identisch ist, bis auf einen noch zu definierenden Rest, der an die N-terminale Aminosäure Valin der β -Kette gebunden ist. Neun Jahre später konnten BUNN u. a. [16] die Struktur dieses Restes aufklären, indem sie durch Säurehydrolyse Glucose von HbA_1 isolieren konnten.

In weiteren Untersuchungen zeigten sie, daß Glucose langsam und kontinuierlich während der gesamten Lebensspanne der Erythrozyten am Hämoglobin gebunden wird und diese Reaktion nicht enzymatisch abläuft [16]. Der Anteil der glykosylierten Hämoglobins am Gesamthämoglobin beträgt beim Gesunden 4 - 8 % und ist bei schlecht eingestellten Diabetikern um das 3 - 5fache erhöht [14, 15].

Nachdem schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts festgestellt worden war [8], daß bei Diabetikern vermehrt Kohlenhydrate an Proteine gebunden werden [5, 33, 54], fanden DAY et al. 1979, daß sich die Glykosylierung nicht nur auf das



Hämoglobin beschränkt und entdeckten, daß an Plasmaproteinen ähnliche Reaktionen ablaufen [25, 26]. Sie zeigten, daß beim Menschen normalerweise 6 - 15 % des Serumalbumins in glykosylierter Form vorliegt [25], während beim Diabetiker dieser Anteil und auch Werte des glykosylierten Gesamtproteins signifikant erhöht sind [75]. Die verstärkte Glykosylierung wird durch vorangegegangene Hyperglykämien bestimmt und spiegelt so die Einstellung des Diabetikers. Da das Albumin eine Halbwertszeit von 19 Tagen besitzt [93], ermöglicht somit die Messung des glykosylierten Albumins eine Aussage über die Einstellung des Patienten während der vergangenen 3 Wochen.

1.4 Glykosylierungsreaktion und Mikroangiopathie

Die Glykosylierungsreaktion, die im nachfolgenden Kapitel beschrieben wird, ist nicht nur auf bestimmte Proteine beschränkt. Ähnliche nichtenzymatische Reaktionen finden sich mit Proteinen der Erythrozytenmembran [3, 78, 102], intraerythrozytären Enzymen [1], Insulin [31], Lipoproteinen [65, 116], und Kollagen [70, 96]. CERIELLO berichtet von einer Verminderung der Antithrombin III-Aktivität bei Diabetikern, die durch Glykosylierung bedingt sei [24]. LÜTJENS fand bei Diabetikern einen erhöhten Anteil von glykosyliertem Fibrinogen [91]. Auch liegen Informationen über die Glykosylierung von Basalmembranproteinen vor [20].

Diese zuletzt aufgeführten Beobachtungen lassen vermuten, daß die Glykosylierungsreaktion auch für die Entstehung von Spätkomplikationen verantwortlich ist. WILLIAMS et al. [114] wiesen in vitro nach, daß glykosyliertes Albumin - im Gegensatz zu unmodifiziertem - sehr leicht und schnell durch endotheliale Mikropinozytose in den Extravasalraum gelangen kann und das Endothel so verändert, daß auch

unmodifiziertes Albumin hindurchtreten kann. Das könnte die Beobachtung erklären, daß sich bei Diabetikern auch ohne Mikroangiopathie ein niedrigerer Serumalbuminspiegel findet [33, 76, 82]. Unsere nachfolgenden Untersuchungen befassen sich mit der Frage, ob glykosyliertes Serumalbumin und Gesamtprotein geeignete Parameter zur Erfassung der Stoffwechsellage bei Diabetikern darstellen und welche Methode im klinischen Alltag brauchbar erscheint.

1.5 Chemie der Glykosylierung von Proteinen (MAILLARD - REAKTION)

Vor 70 Jahren entdeckte MAILLARD die Reaktion zwischen Aminosäuren und reduzierenden Zuckern [71], die später nach ihm benannt wurde. Lange Zeit beschäftigten sich lediglich die Lebensmittelchemiker mit diesem Phänomen wegen seiner großen Bedeutung hinsichtlich Verarbeitung, Geschmack und Nährwert von Lebensmitteln [43, 50, 64, 84, 99]. Die Reaktion läuft in drei Schritten ab: Ketoamin-Bildung, Entstehung diverser Sekundärprodukte und zuletzt Polymerisierungsreaktion, die zu braunen Melanoidinpigmenten führen [89]. Die erste Phase wird auch als "early Maillard", die zweite und dritte als "advanced Maillard" bezeichnet [39].

Die Reaktion beginnt mit der Kondensation einer Aminogruppe einer Aminosäure mit einem Zucker in Aldehydform. Unter physiologischen Bedingungen existieren Zucker überwiegend in der stabilen Ringform als α - oder β -Pyranosen und nur zu einem geringen Prozentsatz in der offenen Carbonylform [13]. Dabei ist Glucose der am wenigsten reaktionsfähige Zucker, da er nur zu 0,001 - 0,002 % in der offenen Carbonylform vorliegt [13, 77]. Zwar begrenzt dieser Faktor die Reaktionsfähigkeit, doch ist die Kondensation von Glucose weitaus am häufigsten infolge ihrer überragenden biologischen Bedeutung.

Die Bindung von Glucose an eine α - oder ϵ -amino-Gruppe führt zur Bildung eines Aldimins oder Schiff'schen Base. Dieser Vorgang läuft schnell ab, ist reversibel und hängt von sterischen Faktoren und der Basizität der Carbonylgruppe ab [77]. In dem nachfolgenden irreversiblen Schritt wird die Schiff'sche Base via Amadori-Rearrangement in die Ketoamin-Form übergeführt, die äußerst stabil ist und erst durch exzessive Säurehydrolyse in 5-Hydromethylfurfural umgesetzt wird [40].

An diesem Punkt kann die Reaktion entweder beendet sein, wie bei der Glykosylierung von Hämoglobin und Serumproteinen, oder fortschreiten. Der letzte Schritt besteht in der Polymerisierung der Sekundärprodukte zu braunen, unlöslichen Pigmenten, Melanoidinen genannte. Diese Farbstoffe entsprechen jeden gelb-braunen Pigmenten, die sich in alternden und kataraktischen Augenlinsen finden lassen [81].

1.6 Thrombozytenaggregation in vivo und in vitro

Thrombozyten mit einer Lebensdauer von 10 Tagen zirkulieren im Blut als runde, scheibchenförmige Zellen. Kontakt mit Subendothel oder Basalmembran, die infolge von Gefäßverletzungen freiliegen, sowie mit Endothel infolge lokaler oder systemischer Reize [74] bewirkt eine Adhäsion der Thrombozyten in vivo. Sie führt ebenso wie Aggregantienzugabe in vitro (ADP, Kollagen, Serotonin, Arachidonsäure, Immunkomplexe) zu morphologischen Änderungen: die Plättchen entwickeln Pseudopodien, werden kugelförmig und bekommen eine rauhe, stachelige Oberfläche [112]. Dieses Phänomen ist bekannt als "platelet shape change" und stellt die initiale Phase der Plättchenaggregation dar. Dies führt zur Freisetzung der Inhaltsstoffe der Zellgranula: aus den dichten Granula werden ADP, Serotonin und Calcium sezerniert und aus den zahlreicheren α -Granula,

Fibrinogen Plättchenfaktor 4, β -Thromboglobulin und ein "platelet mitogenic factor" [38, 97]. Die Regulierung der Plättchenreaktivität in vivo erfolgt durch die intrazelluläre cAMP- und Calciumkonzentration und das Gleichgewicht zwischen intrathrombozytärer Thromboxan A_2 -Bildung und Prostacyclinsynthese der Gefäßwand [80]. Aus Granula freigesetztes oder zugefügtes ADP besetzt spezifische Rezeptoren der Plättchenmembran [9, 10, 105], führt zur Depolarisierung des Membranpotentials [113], Erniedrigung des cAMP-Spiegels [108] und unter ATP-Verbrauch zur Aggregation, wobei Fibrinogen, Calcium und Magnesium als Cofaktoren nötig sind [86].

Die Bindung von Kollagen an der Plättchenmembran erfolgt vor allem über das Glykoprotein Fibrinectin und ist abhängig von der sterischen Anordnung der Kollagenmoleküle: nur in geordneter quartärer Struktur wird eine starke Adhäsion ausgelöst. Tropokollagen als Monomer bewirkt eine wesentlich schwächere Reaktion [46].

Kollagen führt zur Degranulation und ebenso wie ADP und Thrombin zur Aktivierung der Phospholipase A_2 [83]. Dies führt zur Freisetzung von Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden, Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin [6]. Sie ist ebenso wie im Aggregometer zugegebene Arachidonsäure Substrat der membranständigen Cyclooxygenase und wird über zyklische Endoperoxid-Zwischenstufen zum stark aggregationsfördernden labilen Thromboxan A_2 abgebaut. Zusätzlich bewirkt die Arachidonsäure die Freisetzung der α -Granula [68]. Daneben sind die Thrombozyten durch die membranständigen Faktoren XI und PF 3 und die Abgabe der Gerinnungsfaktoren V, VIII und I direkt am Gerinnungsvorgang beteiligt [73]. Die Konsolidierung des Thrombozytenaggregats durch Fibrin und Retraktion durch Actomyosinelemente der Membran führen schließlich zu stabilen Thrombus. Unsere Aggregationsmessungen der Thrombozyten an Diabetikern, die mit verschiedenen Insulinen

(Humaninsulin, tierisches Insulin) behandelt wurden, sollten zeigen, ob eine unterschiedliche Aggregationsneigung durch unterschiedliche Insulinarten zu messen ist.

1.7 Ziel der Arbeit

Die Untersuchungen in dieser Arbeit sind in drei Teile gegliedert:

Im ersten Teil wird der Einfluß von Zeit, Temperatur, Thrombozytenzahlkonzentration, Aggregantiendosis und Technik der Blutentnahme auf die Aggregation der Thrombozyten diabetischer und gesunder Probanden untersucht. Der zweite Teil zeigt die Entwicklung einer Methode zur Messung der glykosylierten Albumine und Serumproteine. Im dritten Teil der Arbeit wird in einer 5-wöchigen Studie mit 8 Diabetikern und 6 Kontrollpersonen untersucht, ob sich bei Therapie mit Humaninsulin gegenüber tierischem Insulin Unterschiede in der Stoffwechseleinstellung feststellen lassen. Dabei werden verschiedene Laborparameter wie routinemäßig bestimmte Blutlaborparameter, Nüchternblutzucker, mittlere Tagesblutglucose, glykosyliertes Albumin, HBA₁, und die Thrombozytenaggregation untersucht.

2. THROMBOCYTANAGGREGATION

2.1 Reagenzien

Alle benutzten Reagenzien waren pro analysi.

2.1.1 Puffer

2.1.1.1 Tris-Puffer

Tris-Puffer 0,1M wurde auf folgende Weise hergestellt:
12,14g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan werden mit 500 ml
Aqua bidest gemischt, darauf mit 1M HCl auf pH 7,4
eingestellt, mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt und
der pH erneut überprüft.

2.1.1.2 Krebs-Henseleit-Puffer

Die Herstellung von 1000 ml-konzentriertem Puffer geschah
folgendermaßen

Puffer A	NaCl	1200	70
	KCl	47	3,5
	CaCl $\times$ 2H $_2$ O	25	3,68
	MgSO $_4$ $\times$ 7H $_2$ O	12	3,0
	+ Aqua bidest. ad 1000 ml		
Puffer B	KH $_2$ PO $_4$	14,7	2,0
	NaHCO $_3$	250	21
	+ Aqua bidest. ad 1000 ml		

Puffer A und B wurden jeweils 1:5 verdünnt (Aqua bidest)
und mit konzentrierter Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt.

2.1.1.3 Phosphatpuffer

Es wurden 1 molare Vorratslösungen von $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ (MG 228,23) und $NaH_2PO_4 \times H_2O$ (MG 137,99) hergestellt. Um einen 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 zu erhalten, wurden 10 ml der beiden Lösungen gemischt und mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt.

2.1.2 ADP

Adenosin-5-diphosphat von Serva Feinbiochemica Heidelberg wurde mit 0,9%iger NaCl gelöst und eine Vorratslösung von 1 mg/ml hergestellt, die in Portionen zu 1 ml bei $-20^{\circ}C$ gelagert wurde. Die Verdünnung dieser Stocklösung mit kaltem Krebs-Henseleit-Puffer auf 1:10 sowie 1:40 führte zum gebrauchsfertigen Aggregans mit einer Konzentration von 5×10^{-4} beziehungsweise $1,5 \times 10^{-4}$ M/l.

2.1.3 Kollagen

Kollagenreagenz Horm von Hormon-Chemie München enthält pro ml 1 mg native Kollagenfibrillen aus equinen Sehnen. Zur Thrombozytenaggregation wurde das Reagenz mit SKF Horm Puffer 1:40 entsprechend 25 µg/ml verdünnt.

2.1.4 Arachidonsäure

Arachidonsäure reinst, 5,8,11,14-Eicosatetraensäure $C_{20}H_{32}O_2$, MG 304,5 wurde von Serva Feinbiochemica Heidelberg bezogen. Zur Herstellung der Vorratslösung von 10 mg/ml wurde zuerst 1/10 des Lösungsvolumens als n-Hexan zugegeben. Die Aufbewahrung erfolgte bei $-80^{\circ}C$. Für die Versuche wurden jeweils 200 µl entnommen und die Hexan-

phase durch N_2 -Übergasung entfernt. Das ölige Restvolumen wurde in 20 μ l Äthanol und 180 μ l 0,1M Tris-Puffer resuspendiert, was zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml führte.

2.2 Methodik

2.2.1 Blutabnahme

Die Entnahme von 15 ml Venenblut erfolgte mittels einer großlumigen Kanüle in eine 20 ml Kunststoffspritze, die 1,5 ml 3,8%ige Natriumzitratlösung enthielt. Zusätzlich wurde etwa 1 ml Luft angesogen und danach der Spritzeninhalt vorsichtig gemischt.

2.2.2 Thrombozytenaufbereitung

Die Blutprobe wurde anschließend sofort auf 12 verschließbare Plastik-Eppendorfgefäße gleichmäßig verteilt und in der Eppendorf-Tischzentrifuge 3.200 bei 8854g und Raumtemperatur genau 2 Sekunden zentrifugiert. Die Zeit von 2 Stunden erwies sich als geeignetste zur größtmöglichen Ausbeute von plättchenreichem Plasma.

2.2.2.1 Thrombozytenreiches Plasma (Platelet-rich-plasma, PRP₁)

Nach dem Zentrifugieren wurden alle Überstände sehr behutsam mit Eppendorf-Kolbenhubpipetten abgenommen und in ein Plastik-Reagenzglas gegeben. Die Menge an thrombozytenreichem Plasma aus 15 ml Blut betrug durchschnittlich 4,0 ml; zur Unterscheidung von Plasma mit einer definierten Zahl an Plättchen wird dieses thrombozytenreiche Plasma mit PRP₁ angegeben.

Die Thrombozytenkonzentration wurde mit der Sarstedt-Thromboplasma-Methode bestimmt: 50 μ l PRP₁ werden in das Teströhrchen gegeben und nach leichtem Mischen die Neubauer-Zählkammer mit einer Probe gefüllt. Nach 5 Minuten Sedimentierung in einer feuchten Petrischale erfolgte die Auszählung unter dem Mikroskop mit 40-facher Vergrößerung. Die Vierfachwerte wurden gemittelt und mit dem Faktor 5000 multipliziert. Es ergab sich eine Thrombozytenkonzentration mit PRP₁ von 220.000 bis 420.000 pro μ l.

2.2.2.2 Thrombozytenarmes Plasma (Platelet-poor-plasma, PPP)

PPP wurde erhalten, indem man das Restblut 2 Minuten zentrifugierte. Nach Abpipettieren und poolen des Überstands konnte aus 15 ml Blut durchschnittlich 3,8 ml PPP gewonnen werden. Wiederholte Zählungen zeigten, daß das PPP vollkommen frei von Thrombozyten war.

2.2.2.3 Standardisiertes Plasma (PRP₂)

Voraussetzung für die Vergleichbarkeit von Aggregationsmessungen ist eine stets gleichbleibende Thrombozytenzahl. Sie wurde deshalb bei den Vorversuchen innerhalb des Versuchs konstant gehalten, bei der Langzeitstudie auf 200.000/ μ l festgelegt (siehe 2.4.3) und als PRP₂ charakterisiert. Nach Zählung des Thrombozytengehaltes im PRP₁ wurde mit folgender Formel die Menge an PPP ermittelt, die zur vorhandenen Menge an PRP₁ gegeben werden muß, um diese Konzentration zu erhalten:

$$\frac{\text{PRP}_1 \text{ (ml)} \times \text{Thrombozahl}}{200.000} = x \text{ ml}$$

x stellt das Endvolumen von PRP_2 dar;
x ml - PRP_1 (ml): ergibt die fehlenden ml PPP,
die an PRP_1 zugegeben werden müssen, um
 PRP_2 zu erhalten.

2.2.3 Aggregometer-Schreiber-Einheit

Zur Thrombozytenaggregation wurde ein Labor-Aggregometer Typ 2 K Nr. 137 der Firma Fresenius, Bad Homburg, benutzt. Das Gerät arbeitet nach dem Photometerprinzip, wobei das Ausmaß der Aggregation durch eine Zunahme der Lichttransmission gemessen wird. Das Gerät ist mit zwei unabhängig voneinander arbeitenden Lichtkanälen ausgestattet, in die wahlweise 200 oder 400 µl-Plexiglas-Küvetten eingesetzt werden können, so daß zwei Proben gleichzeitig gemessen werden können. Die Betriebstemperatur wird konstant auf 37°C gehalten, die Rührergeschwindigkeit kann stufenlos von 0 rpm bis 2000 rpm reguliert werden. Die Änderung der Lichttransmission wird durch einen Zweikanalflachschreiber (Typ BD 9) der Firma Kipp und Zonen, Delft, mit variabler Spreizung und stufenweise regelbarer Papiervorschubgeschwindigkeit aufgezeichnet.

Für die vorliegenden Versuche wurde eine Rührergeschwindigkeit von 1100 rpm, eine Spreizung von 0,1 V und ein Papiervorschub von 10 mm/min gewählt.

Bei der Auswertung wurde vom maximalen Ausschlag des Schreibers der aufgezeichnete Basis-Leerwert abgezogen und die Differenz als Wert der Aggregation in % angegeben.

2.2.4 Durchführung der Aggregation

Die Aggregationsmessungen erfolgten nach dem von Born angegebenen Verfahren [14]. Eine halbe Stunde vor Meßbeginn wurde das Gerät zum Erreichen der Betriebstemperatur eingeschaltet. Je 400 μ l des bei Raumtemperatur aufbewahrten standardisierten Plasmas RPR₂ wurden in 7 Plexiglas-küvetten pipettiert. Bei der Langzeitstudie erfolgte die erste Messung genau 35 Minuten nach Blutabnahme, jede weitere Messung 7 Minuten später. Dieser genaue Zeitplan war zur interindividuellen Vergleichbarkeit der Meßwerte unbedingt erforderlich, da das Ausmaß der Aggregation stark vom Zeitintervall zwischen Blutabnahme und Meßbeginn abhängt (siehe 2.4.1). Nach Einsetzen der Küvette in den Lichtkanal wurde der Magnetrührer behutsam mit der Pinzette dazugegeben, da Blasenbildung vermieden werden sollte. Durch Drücken der Starttaste wurde der Lichttransmissions-leerwert automatisch kalibriert und eine einminütige gerade Basislinie aufgezeichnet. Nach 1 Minute wurde das Aggregans zupipettiert.

2.2.4.1 ADP-induzierte Aggregation bei Normalpersonen

Nach Zugabe von ADP zeigte sich sofort eine starke Zunahme der Lichttransmission (Abb. 2). Bei der Aggregation können zwei Phasen unterschieden werden: eine reversible "first phase" und eine irreversible "second phase". Bei niedriger Konzentration des zugegebenen Aggregans zeigt sich eine submaximale Aggregation, die "first-phase-aggregation", der sogleich die Desaggregation folgt (1). Dies beruht darauf, daß die Plättchen zwar einem Gestaltwechsel unterliegen und kleine Aggregate bilden, die ADP-Dosis jedoch zur Freisetzung des Inhalts der Zellgranula zu gering ist.

Bei der irreversiblen Aggregation können first- und second-phase entweder noch deutlich voneinander unterschieden werden (2), oder völlig ineinander übergegangen sein (3). Der "second-phase" entspricht die Bildung dichter, unauflöslicher Thrombozytenaggregation infolge Freisetzung von endogenem ADP, Ca^{++} , 5-Hydroxytryptamin, Plättchen- und Gerinnungsfaktoren, die umso schneller erfolgt, je höher die zugeführte ADP-Konzentration war.

2.2.4.2 Kollagen-induzierte Aggregation bei Normalpersonen

Kollagen führte zu unterschiedlichen Aggregationskurven: nach Zugabe des Aggregans fand sich eine Verzögerungszeit von durchschnittlich 60 Sekunden, die auf einer Adhäsion der Blutplättchen an den Kollagenfibrillen beruht [57, 108]. Der nun folgende Gestaltwechsel der Thrombozyten (shape change) vollzog sich langsamer als bei Induzierung mit ADP und führte zu einer kurzfristigen Abnahme der Lichttransmission. Danach kam es entweder zu vollständiger (Abb. 3 Kurve (2)) oder zu reversibler submaximaler (Abb. 3 Kurve (1)) Aggregation.

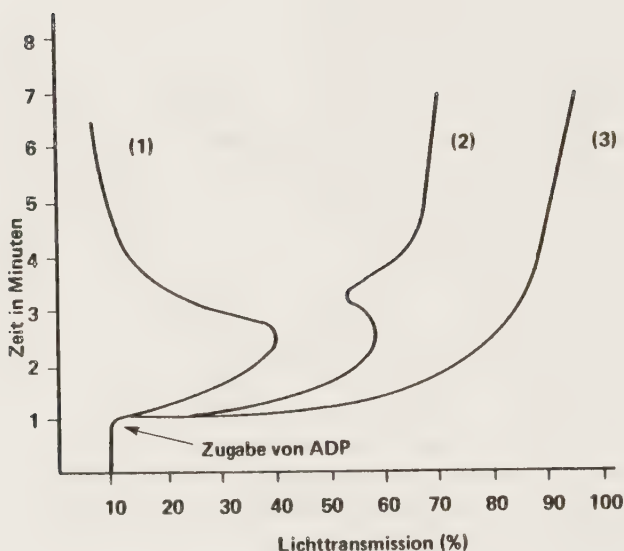


Abb. 2: Beispiele von Kurvenverläufen nach Aggregations-induzierung mit ADP

2.2.4.3. Arachidonsäure-induzierte Aggregation bei Normalpersonen

Die Zugabe von Arachidonsäure führte nur bei einem Teil der Probanden zur Aggregation: es fiel deutlich ein "Alles-oder-Nichts"-Effekt auf, wobei sich bei eingetretener Aggregation kein Unterschied im Ausmaß der Aggregation zeigte, unabhängig davon, ob 300 oder 500 $\mu\text{g/ml}$ PRP_2 zugegeben wurden. Die Dosisabhängigkeit der Reaktion äußerte sich im Unterschied der Frequenz, in der eine Aggregation ausgelöst werden konnte.

Nach Zupipettieren des Aggregats zeigte sich sofort ein Ausschlag entgegen der Hauptrichtung, der nach wenigen Sekunden in der Gegenrichtung verlief (Abb. 4).

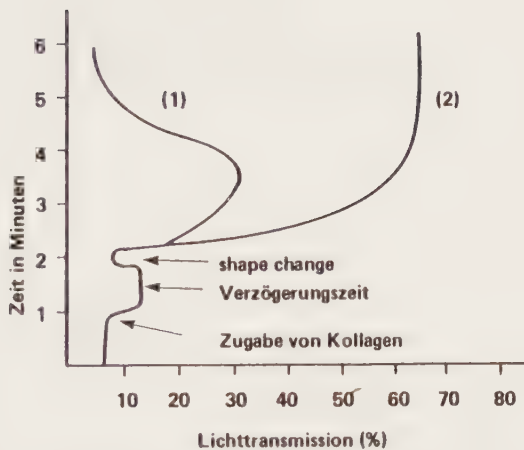


Abb. 3: Kurvenbeispiele nach Aggregationsinduzierung mit Kollagen

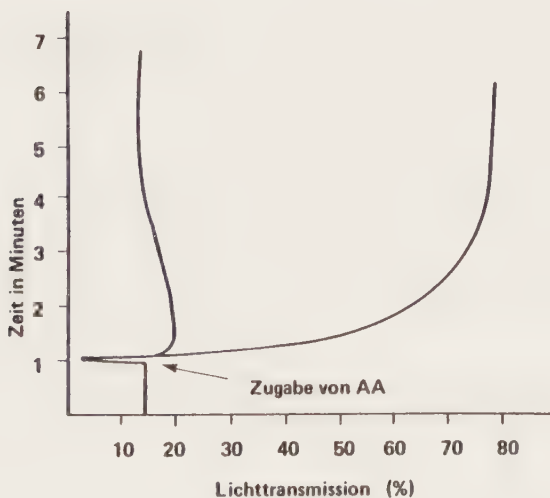


Abb. 4: Kurvenbeispiele nach Aggregationsinduzierung mit Arachidonsäure (AA)

Bei der Kurvenauswertung wurde eine nicht eingetretene Aggregation mit 0% gewertet und bei der Berechnung von Mittelwert und SEM miteinbezogen. Zudem wurde die Frequenz ermittelt, mit der eine Aggregation bei verschiedenen Dosen von Arachidonsäure und abhängig vom untersuchten Kollektiv eintrat (siehe 4.2.3).

2.3 Statistische Auswertung

Die Resultate wurden als $MW \pm SEM$ angegeben.

Die Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung und Standardabweichung des Mittelwerts erfolgte mit einem Diehl alphantronic-Tischrechner.

Die Standardabweichung am Einzelmeßwert (SD) wurde hierbei nach folgender Formel berechnet:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}}$$

Die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) ist:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Für die statistischen Berechnungen am Siemens Computer Data 404 wurde der Student's t-Test für unverbundene Stichproben angewendet. Außerdem wurden Korrelationskoeffizient und lineare Regression berechnet.

2.4 Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von verschiedenen Faktoren

Vor Beginn der Diabetikerstudie sollten einzelne Parameter untersucht werden, die das Aggregationsverhalten der Thrombozyten in vitro beeinflussen, da hierzu in der Li-

teratur widersprüchliche Aussagen vorliegen oder zu gewissen Punkten kaum Untersuchungen zu finden sind.

Das Venenblut für alle Versuche stammte von fünf gesunden, normalgewichtigen Probanden beiderlei Geschlechts, die keine Medikamente einnahmen; kurz vorher hatten sie eine leichte Mahlzeit zu sich genommen. Als Aggregantien kamen ADP und Kollagen in verschiedenen Konzentrationen zum Einsatz.

2.4.1 Zeitabhängigkeit

Die Aggregationsmessungen begannen zwischen 90 und 150 Minuten nach Blutabnahme und wurden über 5 bis 6 Stunden fortgeführt. Die Aufbewahrung erfolgte bei Raumtemperatur, die durchschnittliche Thrombozytenzahl betrug $250.000/\mu\text{l}$ ($\text{MW} \pm \text{SEM}$). Aggregiert wurde mit ADP in einer Konzentration von $2,5 \mu\text{M/l}$ und $5 \mu\text{M/l}$ sowie mit einer Kollagenkonzentration von $2,5 \mu\text{g/ml}$.

In dem von uns untersuchten Zeitintervall nach Blutentnahme zeigte sich eine deutliche Abnahme der Thrombozytenaggregation bei beiden Aggregantien (Abb. 5).

Bei der ADP-induzierten Aggregation ergab sich bei der niedrigeren Konzentration von $2,5 \mu\text{M/l}$ ein stündlicher Abfall der Lichttransmission von 8,2 %, bei Zugabe von $5 \mu\text{M/l}$ ADP eine Abnahme von 4,8 % (Tab. 1). Derselbe Effekt zeigte sich bei Induzierung mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Kollagen: die Abnahme der Lichttransmission in Prozent betrug pro Stunde 5,8 %.

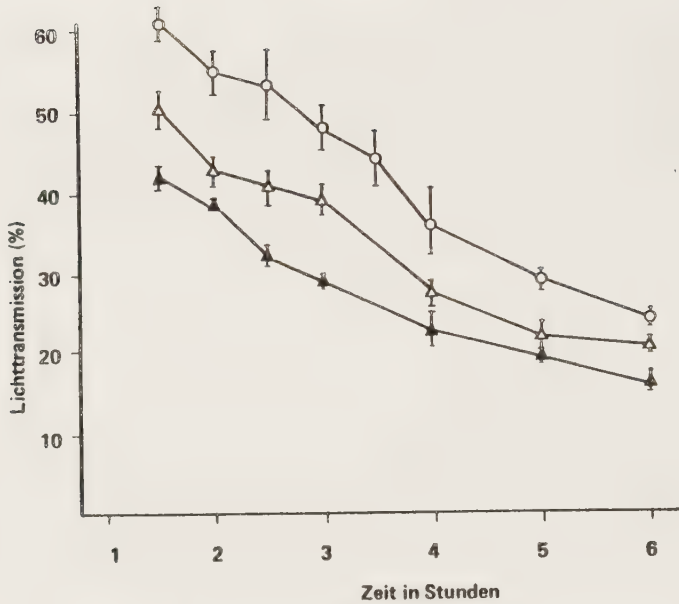


Abb. 5: Abnahme der Lichttransmission in der Zeit bei Aggregationsinduzierung mit ADP 2,5 µM (●—●—●), ADP 5 µM (○—○—○) und Kollagen 2,5 µg (△—△—△).

Aggregans	Lichttransmission
ADP 2,5 µM/l	8,2 % ± 1,7 (6)
ADP 5 µM/l	4,8 % ± 1,2 (5)
Kollagen 2,5 µg/ml	5,8 % ± 0,7 (9)

Tabelle 1: stündliche Abnahme der Lichttransmission in Prozent (MW±SEM). Anzahl der Bestimmungen in Klammern

Bei der Langzeitstudie, die in Abschnitt 4 beschrieben wird, wurde deshalb mit den Aggregationsmessungen möglichst bald nach Blutentnahme begonnen und folgender Zeitplan bei jeder Untersuchung befolgt (Tab. 2):

Zeit nach Blutabnahme	Aggregans
35'	ADP 2,5 $\mu\text{M/l}$
42'	ADP 1,25 $\mu\text{M/l}$
49'	Koll 0,625 $\mu\text{g/ml}$
56'	Koll 1,25 $\mu\text{g/ml}$
1h03'	AA 300 $\mu\text{g/ml}$
1h10'	AA 500 $\mu\text{g/ml}$
1h17'	Spontan

Tabelle 2: Zeitplan der Aggregationsmessungen bei der Langzeitstudie

2.4.2 Temperaturabhängigkeit

Die Plexiglaszküvetten mit je 400 μl PRP_2 desselben Blutspenders ($n = 3$) wurden entweder in Eis gelagert, bei Raumtemperatur (22°C) aufbewahrt oder im Aggregometer bei 37°C . Die in Eis gelagerten Proben wurden für die Messungen vier Minuten vorher im Aggregometer aufgewärmt. Die Untersuchungen begannen 90 Minuten nach Blutabnahme und wurden bis zu 6 Stunden danach aufgezeichnet. Abb. 6a und Abb. 6b zeigen die Abnahme der Lichttransmission in der Zeit von bei verschiedenen Temperaturen gelagertem PRP_2 .

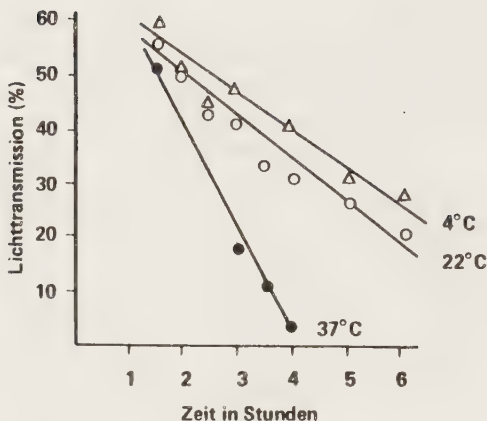


Abb. 6a:

Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von der Aufbewahrungstemperatur. Induzierung mit ADP 5 μ M/l.

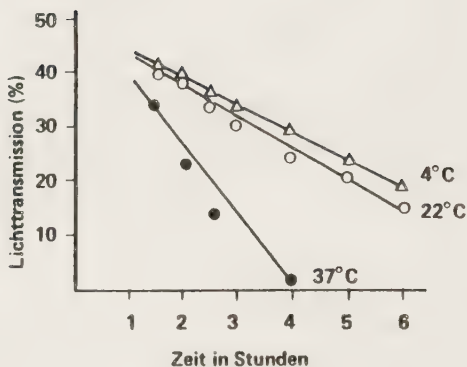


Abb. 6b:

Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von der Aufbewahrungstemperatur. Induzierung mit Kollagen 2,5 μ g/ml.

In Tabelle 3 wurde die Abnahme der Lichttransmission pro Stunde für jedes Aggregans berechnet. Diejenigen Proben, die bei 37°C aufbewahrt worden waren, zeigten eine wesentlich ausgeprägtere Abnahme der Aggregationsfähigkeit als Proben nach Aufbewahrung bei Raumtemperatur (Abb. 6a, 6b). Später als 4 Stunden nach Blutentnahme war bei ersteren keine Aggregation mehr auszulösen.

	4°C	22°C	37°C
ADP 5µM/l	6,2 %	7,3 %	19,2 %
ADP 2,5µM/l	5,5 %	6,3 %	-
Koll 2,5µg/ml	5,2 %	5,3 %	13,6 %
Koll 1,25µg/ml	4,8 %	5,5 %	-

Tabelle 3: Änderung der Lichttransmission in % pro Stunde bei Aufbewahrung des PRP₂ bei 4°C, 22°C (Raumtemperatur) und 37°C.

Die Aufbewahrung in Eis nur zu einer geringfügig schwächeren Aggregationsabnahme pro Stunde führte als Aufbewahrung bei Raumtemperatur, wurden alle weiteren Messungen mit PRP₂ vorgenommen, das bei Raumtemperatur (22°C) aufbewahrt wurde.

2.4.3 Abhängigkeit von der Thrombozytenzahl

Für diese Versuche wurde PRP₁ mit PPP zu Konzentrationen von 100.000, 200.000 und 300.000 Thrombozyten pro µl ausverdünnt. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur, die Messungen begannen 90 Minuten nach Blutentnahme. Tabelle 4 zeigt die prozentuale Zunahme der Lichttransmission bei verschiedenen Thrombozytenkonzentrationen.

	Thrombozytenzahl/ μ l PRP ₂		
	300.000	200.000	100.000
ADP 5 μ M/l	75 $\pm$ 3,0	46 $\pm$ 2,1	15 $\pm$ 1,8
Kollagen 2,5 μ g/ml	73 $\pm$ 3,7	38 $\pm$ 2,1	15 $\pm$ 2,9

Tabelle 4: Änderung der Lichttransmission in % bei durch ADP oder Kollagen induzierter Aggregation von PRP₂ mit verschiedenen Thrombozytenzahlen pro μ l (n = 6, MW $\pm$ SEM)

Es stellte sich eine linear-proportionale Abhängigkeit der Aggregabilität von der Thrombozytenzahl dar, die auf einem rein physikalischen Phänomen beruhen dürfte: die Lichtdurchlässigkeit ist umso geringer, je höher der Thrombozytengehalt im PRP₂ ist und bei Aggregation ist dadurch die Zunahme der Lichtdurchlässigkeit auch größer.

Bei der Langzeitstudie wurden die Aggregationsmessungen aus praktischen Gründen mit einer Thrombozytenkonzentration von 200.000/ μ l im PRP₂ vorgenommen, da zur Erlangung einer höheren Konzentration relativ mehr Venenblut benötigt würde.

2.4.4 Einfluß der Blutabnahmetechnik

Die Frage wurde untersucht, ob bei einer von uns durchgeführten Blutentnahme bei völlig ungestauter Vene andere Meßergebnisse bei der Aggregation gewonnen werden als nach Anlage einer Staubinde. Dazu wurde ein Quick-Cath-Resteck mit weitlumiger Teflonnadel verwendet und je 20 ml bei ungestauter Vene und nach Anlegen der Stauung abgenommen. Die Messungen begannen 70 Minuten nach Blutentnahme und

wurden bei Raumtemperatur mit einer Thrombozytenzahl von 370.000 ± 20.000 durchgeführt.

Thrombozytenreiches Plasma, das nach ungestauter Venenpunktion gewonnen wurde, zeigte eine deutlich stärkere Aggregation: nach Zugabe von $5 \mu\text{M/l}$ ADP lagen die Werte um $48,9 \pm 12,0 \%$ ($\text{MW} \pm \text{SEM}$) höher, verglichen mit PRP_2 nach Abnahme unter Stauung. Bei Induzierung der Aggregation mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ Kollagen fand sich ebenfalls eine deutliche Steigerung der Aggregation bei ungestauter Abnahme: hier lagen die Werte um $48,0 \pm 12,8 \%$ ($\text{MW} \pm \text{SEM}$) höher.

Bei der Langzeitstudie erfolgte die Blutentnahme aus technischen Gründen nach Anlegen einer Stauung.

2.4.5 Zentrifugenvergleich

Um das Zeitintervall zwischen Blutentnahme und Aggregationsbeginn möglichst kurz halten zu können, wurde die Möglichkeit getestet, mit der Eppendorf-Tischzentrifuge 3.200 bei 8.854g (12.000 Umdrehungen/min.) quantitativ und qualitativ gleichwertiges PRP_1 zu erhalten wie nach Zentrifugierung in einer Hettich Roto Silenta-Raumzentrifuge bei 250 g (1000 Umdrehungen/min.).

Thrombozytenzählungen nach jeweils 1,2,3,4,5,6,7 und 8 Sekunden Zentrifugierung in der Eppendorf-Zentrifuge ergaben, daß sich nach 2 Sekunden die größte Anzahl von Thrombozyten im PRP_1 befindet. Thrombozytenzählungen in Blutproben, von denen die eine Hälfte in der Raumzentrifuge 10 Minuten bei 250 g (1.000 Umdrehungen/min.) zentrifugiert wurde und die andere Hälfte 2 Sekunden in der Tischzentrifuge, ergaben vergleichbare Mittelwert mit einer maximalen Abweichung von $\pm 6 \%$.

Zur Feststellung eines eventuell differierenden Aggregationsverhaltens wurden vergleichende Aggregationsmessungen mit ADP und Kollagen durchgeführt. Bei gleicher Thrombozytenkonzentration und gleichem zeitabstand nach Blutent-

nahme ergaben sich für die mit 5 $\mu\text{M}/\text{l}$ ADP induzierte Aggregation $15,6 \pm 7,7 \%$ ($\text{MW} \pm \text{SEM}$, $n=5$) höhere Werte für PRP_1 , das 2 Sekunden in der Tischzentrifuge zentrifugiert wurde im Vergleich zur Raumzentrifuge. Bei Aggregationsauslösung mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen nach Kurzzeitzentrifugierung um $14,9 \pm 5,3 \%$ ($\text{MW} \pm \text{SEM}$, $n=5$) höher verglichen mit PRP_1 nach zehnminütiger Zentrifugierung in der Raumzentrifuge.

Da eine Zentrifugierung bei hoher Umdrehung über nur 2 Sekunden die Zubereitungszeit verkürzt und die Plättchenreaktivität nicht beeinträchtigt, wurde bei der Langzeitstudie auf diese Weise vorgegangen.

2.4.6 Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von der Aggregantienkonzentration

Um eine eventuell gesteigerte Thrombozytenaggregation bei Diabetikern feststellen zu können, sind für die Untersuchungen Konzentrationen der Aggregantien erforderlich, die zu einer submaximalen Aggregation der Thrombozyten führen.

In dieser Versuchsreihe sollte anhand ansteigender Konzentrationen von ADP (0,625 μM , 1,25 μM , 5 μM und 10 μM pro Liter) und Kollagen (0,625 μg , 1,25 μg , 2,5 μg und 5 μg pro ml) diejenigen Dosen ermittelt werden, die bei Normalpersonen submaximale Aggregationskurven bewirken. Die Messungen ($n=8$) begannen 30 Minuten nach Blutabnahme und wurden nur jeweils 4 Minuten lang durchgeführt, um den Zeitfaktor möglichst gering zu halten; die Thrombozytenkonzentration betrug 200.000/ μl .

Die Induzierung der Aggregation mit 5 $\mu\text{M}/\text{l}$ ADP führte bei allen Probanden zur Maximalaggregation ($51 \pm 2,8 \%$, $\text{MW} \pm \text{SEM}$), bei Verdoppelung der Dosis ließen sich die Werte

nicht weiter steigern ($46 \pm 3,5 \%$, $MW \pm SEM$) (Abb. 7). Die Aggregationskurven zeigten in allen Fällen eine irreversible "second-phase" Aggregation.

Bei Verwendung von $2,5 \mu M/l$ und $1,25 \mu M/l$ ADP lagen die Mittelwerte deutlich niedriger: $41 \pm 3,3 \%$ bzw. $21 \pm 1,6 \%$ ($MW \pm SEM$); diese Konzentrationen wurden demgemäß in der

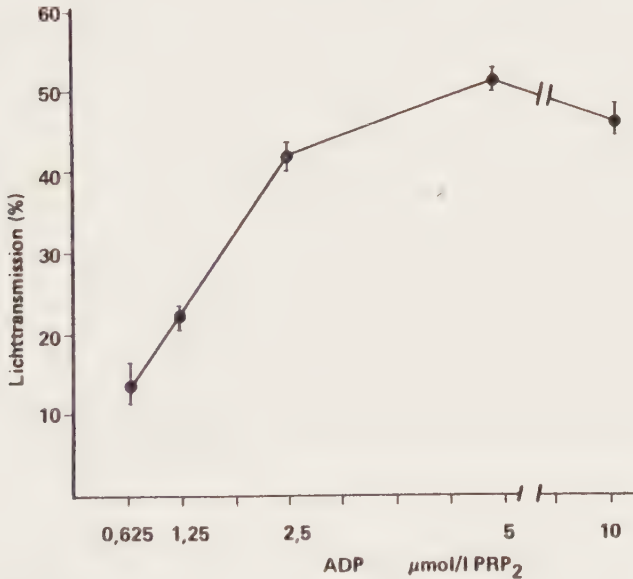


Abb. 7: Einfluß steigender ADP-Konzentrationen auf die Zunahme der Lichttransmission

Diabetikerstudie verwendet. Hier war die first-phase-Kurve entweder von Desaggregation erfolgt, oder es schloß sich eine noch deutlich unterscheidbare second-phase-Kurve an. Zugabe von $0,625 \mu M/l$ ADP führte zu einer schwachen first-phase Aggregation ($13 \pm 6,0 \%$, $MW \pm SEM$), die in allen Fällen von Desaggregation gefolgt war (Abb. 8).

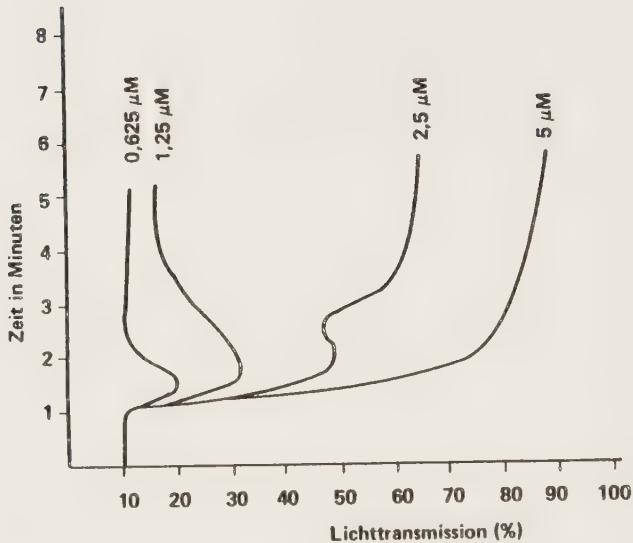


Abb. 8: Beispiel der Aggregationskurvenverläufe nach Zugabe verschiedener ADP-Konzentrationen

Bei der Aggregation mit Kollagen zeigte sich ebenfalls eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration (Abb. 9). Induzierung mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen führte in allen Fällen zur Maximalaggregation ($52 \pm 7,3 \%$, $\text{MW} \pm \text{SEM}$); oft wurde sie auch bei Verwendung von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet ($44 \pm 5,7 \%$, $\text{MW} \pm \text{SEM}$). Bei Kollagenkonzentrationen von 1,25 $\mu\text{g/ml}$ und 0,625 $\mu\text{g/ml}$ ergaben sich Mittelwerte von $42 \pm 4,7 \%$ bzw. $30 \pm 7,0 \%$ ($\text{MW} \pm \text{SEM}$).

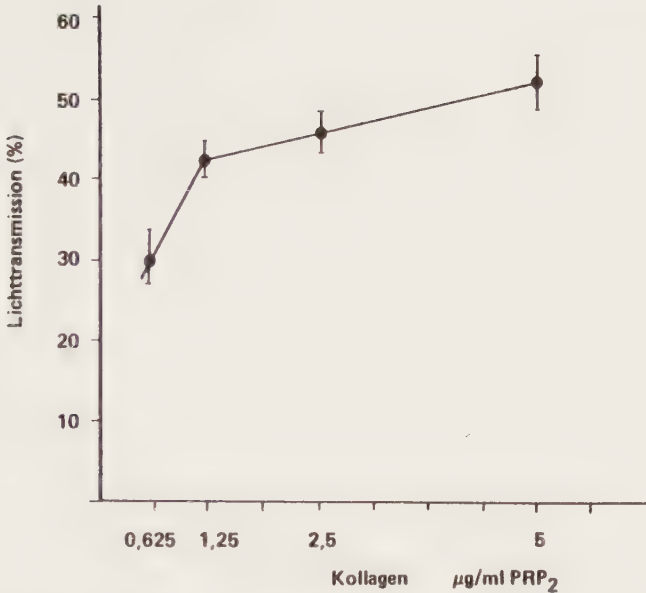


Abb. 9: Einfluß steigender Kollagen-Konzentrationen auf die Zunahme der Lichttransmission

Die niedrigste Kollagenkonzentration von 0,625 $\mu\text{g/ml}$ reichte nicht in allen Fällen zur Induzierung einer vollständigen Aggregation aus; oft folgte nach kurzer Zeit die Desaggregation (Abb. 10).

Insgesamt zeigte sich bei Induzierung mit Kollagen eine stärkere interindividuelle Schwankung der Dosisabhängigkeit als bei ADP, was sich auch aus höheren SEM-Werten erkennen läßt.

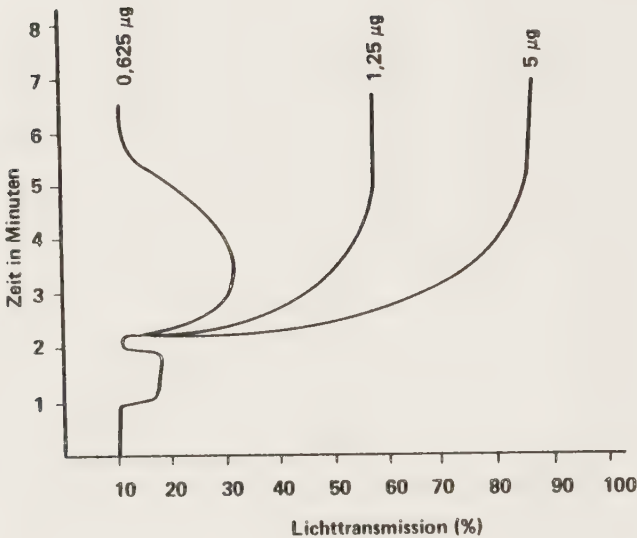


Abb. 10: Beispiel der Aggregationskurvenverläufe nach Zugabe verschiedener Kollagen-Konzentrationen

2.4.7 Aggregation in nüchternem und nicht-nüchternem Zustand

Zur Klärung der Frage, ob sich das Ausmaß der Thrombozytenaggregation wesentlich ändert, wenn die Blutentnahme nicht am nüchternen Probanden, wie es bei diabetischen Patienten erwünscht wäre, sondern postprandial erfolgt, wurde bei drei gesunden Normalpersonen an zwei verschiedenen Tagen die Aggregation gemessen. Die Blutentnahme erfolgte zur selben Uhrzeit; zur ersten Untersuchung erschienen die Probanden nüchtern, vor der zweiten Untersuchung hatten sie eine kleine Mahlzeit eingenommen.

Die Thrombozytenzahl im PRP₂ betrug 200.000 pro μl , die Aufbewahrung des Plasmas erfolgte bei Raumtemperatur. Es zeigte sich eine stärkere Aggregation, wenn die Blutentnahmen postprandial erfolgt waren; die Zunahme betrug bei Induzierung mit $2,5 \mu\text{M/l}$ ADP $11 \pm 2,4 \%$ (MW $\pm$ SEM), bei Zugabe von $500 \mu\text{g/ml}$ Arachidonsäure $7 \pm 2,4 \%$ (MW $\pm$ SEM). Bei Kollagen ergab sich kaum eine Veränderung: es ließ sich eine Abnahme von $0,3 \pm 0,2 \%$ (MW $\pm$ SEM) verzeichnen.

2.5 Qualitätskontrolle

Der mittlere Variationskoeffizient von Proben derselben Versuchsperson ($n=3$), die an jeweils sechs verschiedenen Tagen untersucht wurden, betrug bei Aggregationsinduzierung mit ADP $2,5 \mu\text{M} \pm 17,8 \%$ und für ADP $1,25 \mu\text{M} \pm 31,2 \%$. Bei Zugabe von Kollagen ergab sich bei einer Konzentration von $1,25 \mu\text{g/ml}$ ein Variationskoeffizient von $\pm 29,8 \%$, bei $0,624 \mu\text{g/ml}$ Kollagen $\pm 82,3 \%$.

3. GLYKOSYLIERTE PROTEINE

3.1 Probensammlung

10 ml heparinisiertes Blut wurde unmittelbar nach Venenpunktion 10 Minuten bei 2000 g (3000 Umdrehungen/Min.) zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde mittels Eppendorf-Pipette vorsichtig abgesaugt und in Dialyseschläuche eingegeben. Die anschließende Dialyse in 1000 ml 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 hatte zum Zweck, die freie Glucose aus dem Plasma vollständig zu eliminieren. Die an das Albumin gebundene Glucose, die später dann gemessen werden soll, kann dabei nicht entfernt werden und bleibt im Plasma zurück.

Die Dialyseschläuche wurden im Meßzylinder eingehängt und 12 Stunden in einem Kühlraum bei + 5°C auf Magnetrührapparaten belassen. Das dialysierte Plasma wurde bis zur Analyse bei - 20°C aufbewahrt.

3.2 Bestimmung des glykosylierten Albumins (GSA)

3.2.1 Prinzip der Methode

Nach affinitätschromatographischer Trennung des Albumins von den Serumproteinen und Konzentrierung auf 10 mg Albumin/ml erfolgt die Säurehydrolyse über 24 Stunden bei 92°C. Dadurch reagiert nichtenzymatisch gebundene Glucose zu 5-Hydroxy-2-methylfurfuraldehyd (HMF), das nach Zugabe von Thiobarbitursäure (TBA) einen gelblichen Farbkomplex bildet, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 443 nm erfaßt werden kann.

3.2.2 Affinitätschromatographische Trennung des Albumins mit "Affi Gel Blue"

Als Chromatographiesäulen wurden 10 ml Kunststoffspritzen (ohne Stempel) verwendet, die in einen selbstgebauten Ständer eingehängt wurden. In die Säulen wurden 7 ml "Affi Gel Blue" (BIO-RAD Laboratories, Richmond USA) eingegeben und mit 14 ml 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 vorgespült. Um eine konstante und gleichmäßige Zufuhr der Elutionsflüssigkeiten in die Säulen zu gewährleisten erfolgte der Transport mittels einer Ismatec-Schlauchpumpe. Nun wurde 1 ml des dialysierten Plasmas mitten auf die Säule pipetiert und anschließend mit 14 ml Phosphatpuffer sämtliche Serumproteine außer Albumin eluiert. Mit 14 ml Phosphatpuffer, der zusätzlich 1,6 M NaCl enthält, erfolgte die Elution von Albumin, das mit einem Tropfenfraktiometer in 14 Fraktionen à 1 ml (= 17 Tropfen) aufgefangen wurde. Danach wurden die Chromatographiesäulen mit 12 ml 8 M Harnstoff in 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 regeneriert und zum Aufbewahren mit 0,02%iger Natriumazid-Lösung gespült, um möglichem Bakterien- oder Pilzwachstum vorzubeugen. Fraktion 4 - 9 wurden gepoolt (= 6 ml) und mittels Biuret-methode die Albuminkonzentration gemessen.

3.2.3 Konzentrierung des Chromatographieeluats

Von den 6 ml des ursprünglichen Chromatographieeluats wurden 600 µl benutzt, um die Albuminkonzentration im Eluat mittels Biuretmethode zu bestimmen. Zusätzlich wurde mit 500 µl des Eluats eine Elektrophorese zur Reinheitskontrolle des Albumins durchgeführt. Anschließend wurde das Eluat eingeeengt. Diese Konzentrierung der Proben erfolgte mit dem Millipore Pellicon Karussell (XX 4200050) mit 4 Molekularfiltrationszellen unter Verwendung von Millipore

Pellicon Membranen PSED 02510, deren Porengröße so bemessen war, daß die relativ großen Albuminmoleküle (MG 67.000) die Membran nicht passieren konnten. Nach Einengung wurde nochmals eine Albuminkonzentrationsmessung mittels Biuret vorgenommen, um die exakte Albuminkonzentration zu ermitteln.

3.2.4 Säurehydrolyse und Messung von 5-HMF

Nach der modifizierten Methode von DOLHOFER [39] wurden 400 µl Eluat mit einem Albumingehalt von 10 mg/ml mit 60 µl Eisessig gemischt und 24 Stunden in einem Eppendorf Wärmeblock 3401 bei einer konstanten Temperatur von 92°C erhitzt. Diese Reaktion führt zur Spaltung der nonenzymatisch gebildeten 1-amino-1-deoxy-2-ketose (Ketoamin), wobei pro Mol gebildeten 5-Hydroxymethyl-2-furfurals 3 Mol H₂O freiwerden.

Nach Abkühlung im Eisbad für 5 Minuten wurden zur Proteinfällung 100 µl 3 M Trichloressigsäure zugegeben, sehr gründlich gemischt und 10 Minuten lang in einer Eppendorf-Zentrifuge Modell 3200 bei 8854 g (12.000 Umdrehungen/Min.) zentrifugiert. Vom Überstand wurden 400 µl in ein neues Eppendorfgefäß abpipettiert, 200 µl 0,05 M Thio-barbitursäure dazugegeben und bei 40°C 30 Minuten lang in einem Eppendorf Hitzeblock inkubiert. Danach wurde der Gehalt der einzelnen Proben an 5-Hydroxymethylfurfural bei einer Extinktion von 443 nm im Photometer gemessen und nach folgender Formel berechnet:

$$350 \cdot \Delta E = \frac{\mu\text{mol HMF}}{\text{mmol Albumin}}$$

3.3 Abhängigkeit der GSA - Bestimmung von verschiedenen Faktoren

3.3.1 Kontrolle der Albuminwiederfindung nach Affinitätschromatographie mittels ^{51}Cr -Albumin

Mit radioaktiv markiertem Albumin (^{51}Cr -Albumin) wurde nachgewiesen, daß $15 \pm 3,7 \%$ aufgetragenen Gesamtalbuminmenge auch nach gründlichster Regeneration mit 8 M Harnstoff in der mit Affi-Gel bepackten Chromatographiesäule verbleiben.

Aus diesem Grund wurde frisches Affi-Gel vor der ersten Verwendung zu Meßreihen mit 20%igem Rinderalbumin durchgespült und mit 20 ml 8 M Harnstoff regeneriert. Danach war die Wiederfindung von aufgetragenem dialysiertem Serumalbumin $91,5 \pm 8,6 \%$ ($\text{MW} \pm \text{SD}$), so daß angenommen werden kann, daß die freien Bindungen der Cibacron^R-Agarose für Albumin dadurch abgesättigt sind und nachfolgend aufgetragenes Albumin wieder vollständig eluiert werden kann.

3.3.2 Einfluß des pH der Elutionspuffer auf die Albuminwiederfindung nach Affinitätschromatographie

In diesem Versuch wurde geprüft, ob die Albuminausbeute durch pH-Änderung des 0,02 M Phosphatpuffers + 1,6 M NaCl optimiert werden kann.

Nachdem die mit Affi-Gel gefüllten Chromatographiesäulen vorgespült, das Serum aufgetragen und die Serumproteine außer Albumin mit Phosphatpuffer vollständig eluiert waren, wurden je 3 Versuchsreihen mit 1,6 M NaCl Phosphatpuffer von pH 6,8 und pH 8,0 durchgeführt.

Das Ergebnis zeigt, daß die Albuminausbeute bei einem Elutionspuffer von pH 6,8, bezogen auf den Ausgangswert des dialysierten Serumalbumins von 100 %, bei $82 \pm 3 \%$ ($\text{MW} \pm \text{SEM}$) liegt, während sich bei einem Elutionspuffer von

pH 8,0 eine Konzentration des Albumineluats von $73 \pm 3 \%$ (MW $\pm$ SEM) fand. Da also bei Elution mit 0,02 M Phosphatpuffer in 1,6 M NaCl pH 6,8 die Wiederfindung von Albumin deutlich besser ist, wurden alle folgenden Versuche mit diesem Puffer durchgeführt.

3.3.3 Einfluß der NaCl-Konzentration des Elutionspuffers auf die Albuminwiederfindung

Mit diesen Versuchen sollte die Abhängigkeit des Albumingehaltes im Eluat von der NaCl-Konzentration des 0,02 M Phosphatpuffers pH 6,8 bestimmt werden.

Dazu wurden sechs Versuchsreihen mit 1,4 M, 1,6 M und 1,8 M Phosphatpuffer durchgeführt.

Die Wiederfindung nach Elution mit 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 plus 1,4 M NaCl, 1,6 M NaCl oder 1,8 M NaCl betrug $78 \pm 2,0 \%$ (MW $\pm$ SEM), $85 \pm 4,6 \%$ (MW $\pm$ SEM) und $75 \pm 2,0 \%$ (MW $\pm$ SEM) respektive, bezogen auf den Ausgangswert des Serumalbumins von 100 %.

Deshalb wurde bei Durchführung der weiteren Versuche als Elutionspuffer 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 plus 1,6 M NaCl gewählt.

3.3.4 Abhängigkeit der 5-HMF-Bildung von der Proteinkonzentration

Um die Rolle verschiedener Albuminkonzentrationen im Hinblick auf die HMF-Messung zu testen, wurde eine Versuchsreihe mit neun verschiedenen Albuminkonzentrationen zwischen 5 und 20 mg/ml Albumin durchgeführt.

9 ml Serum einer Normalperson wurden dialysiert, jeweils 1 ml chromatographiert und die Elutionsfraktionen 4 - 9

gepoolt. Anschließend wurden die neun gepoolten Eluate auf nachfolgende Konzentrationen eingengt: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 20 mg Albumin pro ml.

Die Auswertung der danach durchgeführten HMF-Messung zeigte eine linear-proportionale Abhängigkeit der HMF-Bildung von der Albuminkonzentration (Abb. 11).

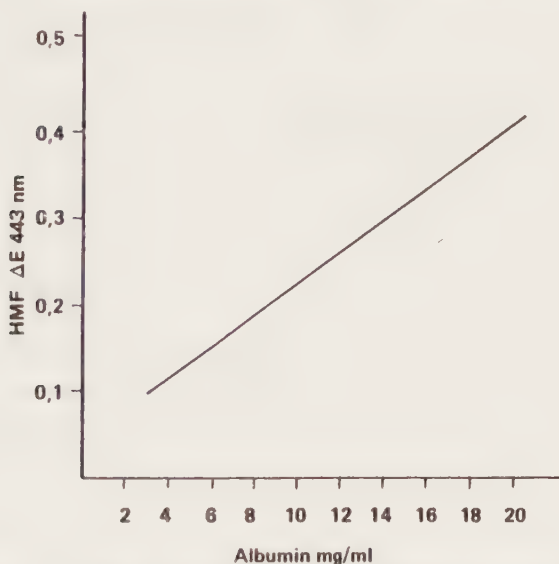


Abb. 11: HMF-Bildung bei verschiedenen Albuminkonzentrationen

Bei der Langzeitstudie wurden die eluierten gepoolten Fraktionen auf 10 mg/ml Albumin eingengt.

3.4 Fließschema zur Bestimmung des glykosylierten Albumins

6 ml Plasma in 1000 ml 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 12 Stunden bei + 5°C dialysieren



7 ml "Affi Gel Blue" auf die Chromatographiesäule geben



mit 14 ml Phosphatpuffer pH 6,8 vorspülen



1 ml dialysiertes Plasma auf die Säule pipettieren und mit 14 ml 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 übrige Serumproteine eluieren.



mit 14 ml 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 + 1,6 M NaCl das Albumin eluieren und in Fraktionen à 1 ml auftragen



Chromatographiesäulen mit 12 ml 8 M harnstoff in 0,02 M Phosphatpuffer pH 6,8 regenerieren



Fraktionen 4 - 9 poolen und Albuminkonzentration messen



Eluat in die Molekularfiltrationszellen mit Millipore Membranen PSED auf eine Konzentration von 10 mg/ml einengen



Zur Säurehydrolyse 400 µg konzentriertes Eluat mit 60 µl Eisessig mischen



24 Stunden lang im Eppendorf Wärmeblock bei 92°C erhitzen



5 Min. im Eisbad kühlen



100 µl 3 M Trichloressigsäure zugeben, mischen



10 Min. bei 8854 g (12.000 U/Min) zentrifugieren



400 µl Überstand abpipettieren, 200 µl 0,05 M Thiobarbitursäure dazugeben



30 Min. bei 40°C im Hitzeblock inkubieren



ΔE bei 443 nm im Photometer messen

$$\Delta E \cdot 350 = \frac{\mu\text{mol HMF}}{\text{mmol Albumin}}$$

3.5 Bestimmung der glykosylierten Serumproteine

Nach Bestimmung des Proteingehaltes wurde das dialysierte Plasma mit 0,9 % NaCl auf eine Eiweißkonzentration von 5 mg/ml verdünnt. Je 400 μl davon wurden mit ^[60] μl Essig gründlich gemischt und 24 Stunden im Hitzeblock bei 92°C inkubiert.

Danach folgte der Thiobarbitursäure-Assay wie in 3.4.3 beschrieben.

3.6 Weitere Labormethoden

3.6.1 Glykosyliertes Hämoglobin (HbA₁)

HbA₁ wurde mit der Mikrosäulen-Technik mit Aldimin-Eliminator bestimmt; dazu wurde das Isolab "Fast Hemoglobin Test System" von Panchem (Kleinwallstadt) verwendet.

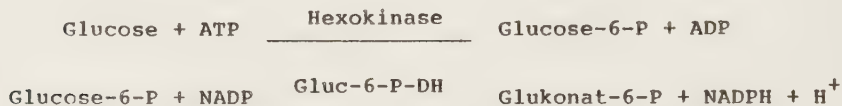
50 μl EDTA-Blut werden mit 100 μl Aldimin-Eliminator vermischt und 10 Min. stehen gelassen. Nach Verdünnung mit 100 μl Aqua dest. werden davon 50 μl auf die Harzsäule pipettiert. Mit 4 ml Elutionslösung Nr. 1 wird die "schnellwandernde HbA₁-Fraktion" ausgewaschen (Lösung A). Die andere Hb-Fraktion wird mit 4 ml Elutionsreagenz Nr. 2 ausgespült und mit 16 ml H₂O verdünnt (Lösung H).

Die Absorption beider Fraktionen wird bei 415 nm gemessen, als Leerwert dient H₂O. Der prozentuale HbA₁-Anteil wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A}{A + 5H} \times 100 \% = \% \text{ HbA}_1$$

3.6.2 Serumzucker

Die Bestimmung erfolgte nach der Hexokinase-Methode von Boehringer Mannheim mit 50 µl Serum nach folgendem Prinzip:



wobei die gebildete Menge NADPH aus der Extinktionszunahme bei 365 nm errechnet wird.

3.6.3 Serumelektrophorese

Die Elektrophorese der Serumproteine wurde mit der klinischen Routinemethode durchgeführt: die Färbung erfolgte nach Ponceau S, zur Auftragung wurden Acetatfolien verwendet.

3.6.4 Serumproteinbestimmung

Sie erfolgte unter Verwendung des Testkits von Merck Darmstadt. 200 µl des chromatographierten Eluats werden mit 1000 µl Perchlorsäure 0,66M vermischt und 10 Min. stehen gelassen. Nach Zentrifugieren und Abpipettieren des Überstands werden 1000 µl Biuret-Lösung zugegeben, gründlich aufgeschüttelt und nach 30 Minuten die Extinktion bei 546 nm abgelesen.

Die Konzentration wurde unter Mitverwendung eines Standards nach der Formel $\frac{600}{\text{Standard}} \times \Delta E$ berechnet.

3.7 Korrelationsberechnungen (Stoffwechselfparameter)

Die folgenden Tabellen zeigen die Korrelationen, die zwischen den Parametern Glucose, GSA, GSP und HbA_1 bestehen. Die Daten stammen von 15 insulinpflichtigen Typ I-Diabetikern, die regelmäßig die Diabetiker-Ambulanz aufsuchten (Tab. 5) und 14 gesunden Kontrollpersonen (Tab. 6). Bei jeder Untersuchung wurden die postprandiale Serumglukose, HbA_1 und glykosyliertes Albumin bestimmt; die Messung des glykosylierten Serumproteins wurde nur bei einem Teil der Probanden ($n=13$) durchgeführt.

Die Bestimmung der Parameter erfolgte mehrmals (3 - 6mal) bei beiden Kollektiven jeweils im Abstand von zwei bis acht Wochen (Tab. 7).

Zur Prüfung des Korrelationskoeffizienten bei zweiseitiger Fragestellung wurden Einzelwerte desselben Untersuchungstages als Wertepaare eingegeben.

Patient	Ge- schlecht	Alter (J)	Diabetes- dauer(J)	Spät- symp.	% Ideal- gewicht
I.B.	w	29	14	R	100
N.D.	m	49	10	R, Neu	113
M.G.	w	58	29	R, Neu	102
E.H.	m	39	15	R, Neu	100
E.K.	w	22	11	-	108
A.L.	m	27	10	-	90
A.S.	m	38	7	-	107
E.W.	m	41	24	R, Neu	111
T.M.	m	36	0,5	-	95
K.L.	w	61	7	R	84
S.M.	m	35	19	R	120
P.D.	m	44	12	R	86
Z.S.	w	16	1,5	-	103
K.L.	m	55	19	R	122
B.I.	m	40	3	-	113
MW±SEM		39±3,3	12±2,1		104±2,9

Tabelle 5: Klinische Daten der diabetischen Patienten (n=15), bei denen Glucose, HbA_{1c}, GSA und GSP bestimmt wurden.

R = Retinopathie, Neu = Neuropathie

Patient	Ge- schlecht	Alter (J)	Diabetes- dauer(J)	Spät- sympt.	% Ideal- gewicht
K.N.	w	28	102	I.B.	
M.I.	m	43	99	E.H.	
S.B.	w	23	98	E.K.	
B.T.	m	27	88	L.A.	
L.R.	m	43	92	A.S.	
M.O.	m	43	110	E.W.	
G.R.	m	35	11	OT.M.	
R.H.	w	22	102	K.E.	
R.P.	w	56	109	K.L.	
W.A.	m	33	97	S.M.	
K.O.	m	40	109	P.D.	
A.C.	w	17	98	Z.S.	
B.F.	m	53	115	K.L.	
H.K.	m	41	125	B.I.	
MW±SEM		36±3,1	104±2,6		

Tabelle 6: Daten der gesunden Kontrollpersonen (n=14), bei denen Glucose, GSA und GSP bestimmt wurden.

Zwischen den HbA_1 -Werten und denjenigen des glykosylierten Albumins (GSA) fand sich eine hochsignifikante Korrelation ($p<0,001$) sowohl im Gesamtkollektiv aller Diabetiker (Tab. 8) als auch bei den Untergruppen der Diabetiker mit bzw. ohne Spätkomplikationen (Tab. 9 und 10 und Abb. 16).

Beim Vergleich des glykosylierten Albumins (GSA) mit der Serumglukosekonzentration fand sich eine signifikante Korrelation bei der Gruppe aller Diabetiker (Tab. 8 und Abb. 17) und bei den Diabetikern ohne Spätkomplikationen (Tab. 9), wohingegen die HbA_1 -Werte nur in der Untergruppe

der Diabetiker ohne Spätsymptome mit den Glucosespiegeln korrelierten. Glykosyliertes Serumprotein (GSP) korrelier-

	alle Diabetiker n=15	Diabetiker (-) n=6	Diabetiker (+) n=9	Normalpersonen n=14
HbA ₁ in %	10,0±2,0	9,5±1,2	10,2±2,3	-
GSA $\frac{\mu\text{mol HMF}}{\text{nmol Alb}}$	129±26	128±18	130±29	97±14
Glucose mg/dl	189±75	201±59	181±77	100±14
GSP $\frac{\text{nmol HMF}}{\text{mg Protein}}$	0,59±0,15	-	-	0,42±0,13

Tabelle 7: Mittelwerte der Stoffwechselfparameter (MW±SD), aus deren Einzelwerten die Korrelationen berechnet wurden
± ≙ Standardabweichung
(-) / (+) = Bedeutung in der Legende

	HbA ₁	GSA	GSP
Glucose	n.s. (63)	r = 0,358 (65) p < 0,01	r = 0,573 (12) p < 0,05
HbA ₁	-	r = 0,571 (59) p < 0,001	r = 0,735 (7) p < 0,05

Tabelle 8: Korrelationen der Stoffwechselfparameter bei allen Diabetikern (n=15). Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der einzelnen Wertepaare an.

te ebenfalls mit HbA_1 sowie mit den Glucosewerten in der Gruppe aller Diabetiker (Tab. 8).

	HbA_1	GSA
Glucose	$r = 0,584$ (21) $p < 0,01$	$r = 0,659$ (24) $p < 0,001$
HbA_1	-	$r = 0,656$ (20) $p < 0,001$

Tabelle 9: Diabetiker ohne Spätkomplikationen (n=6);
Zahlen in Klammern $\hat{=}$ Wertepaare

	HbA_1	GSA
Glucose	n.s. (42)	n.s. (41)
HbA_1	-	$r = 0,541$ (39) $p < 0,001$

Tabelle 10: Diabetiker mit Spätkomplikationen (n=9);
Zahlen in Klammern $\hat{=}$ einzelne Wertepaare

Korrelationen, die für die Werte des GSA, GSP und Glucose des Normalkollektivs berechnet wurden, ergaben in keinem Fall statistisch signifikante Ergebnisse.

GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER PUNKTWOLKE.
DIE VERÄNDERUNG DER BEIDEN Y ERGIBT DIE REGR.GER. (Y NACH X). ANALOG FÜR DIE BEIDEN X (X NACH Y).

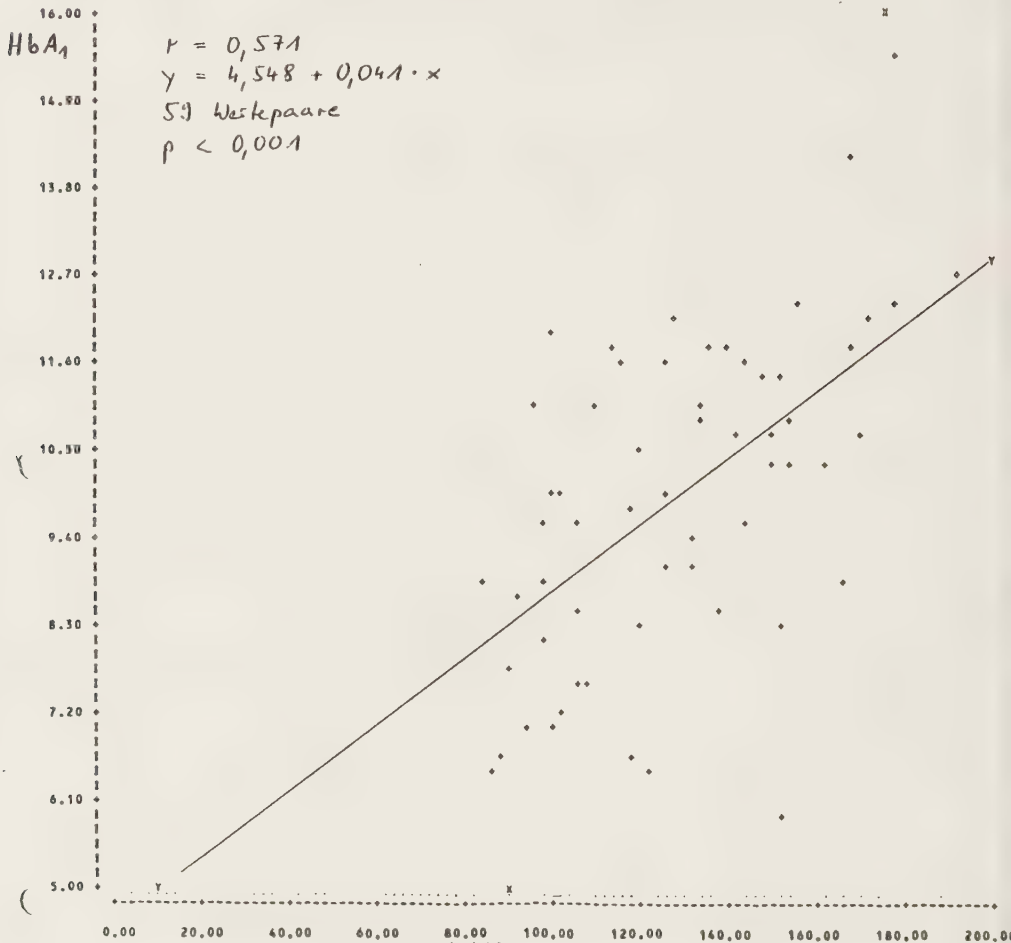
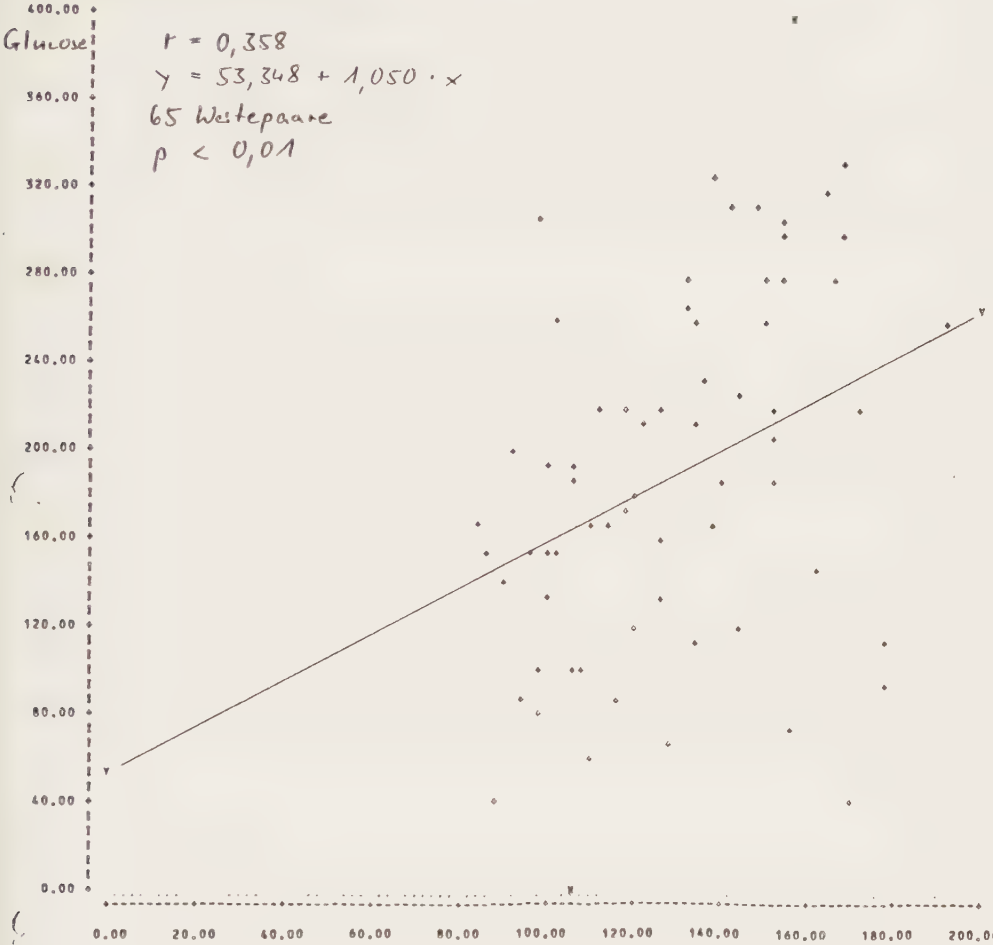


Abbildung 16: Korrelation zwischen den HbA_{1c}-Werten ($9,9 \pm 1,7$ MW $\pm$ SD) und glykosyliertem Serumalbumin (GSA, 128 ± 23 MW $\pm$ SD) bei insulinpflichtigen Diabetikern.

GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER PUNKTWOLKE.
DIE VERBUNDUNG DER BEIDEN Y ERGIBT DIE REGR.GEN. (Y NACH X). ANALOG FÜR DIE BEIDEN X (X NACH Y).



GSA

Abbildung 17: Korrelation zwischen Blutglukosekonzentration (189 ± 75 MW $\pm$ SD) und glykosyliertem Serumalbumin (GSA, 129 ± 26 MW $\pm$ SD) bei insulinpflichtigen Diabetikern.

3.8 Qualitätskontrolle

Bei der Albuminchromatographie ergab sich eine durchschnittliche Ausbeute im Eluat von $91,5 \% \pm 8,6$ (MW $\pm$ SD, n=29). Der Variationskoeffizient für sechsmalige Bestimmung des GSA von Proben derselben Versuchsperson (n=3) lag bei $\pm 5,2 \%$.

4. CROSS - OVER STUDIE

4.1 Versuchsanordnung und Patienten

Zu Beginn der Studie wurden Patienten und Kontrollpersonen ausführlich informiert und gaben alle ihr Einverständnis.

4.1.1 Patientenkollektiv

An dieser Studie nahmen 8 Patienten teil, die aus der Ambulanz der Medizinischen Klinik Innenstadt München stammen (Tab. 11). Alle sind insulinpflichtige Typ I-Diabetiker mit einer durchschnittlichen Diabetesdauer von 14,8 Jahren (7 - 29 Jahre).

Bei 6 von ihnen lagen Spätsymptome im Sinne einer Retinopathie vor, die ophthalmologisch diagnostiziert worden waren. Zusätzlich fanden sich bei 4 von ihnen klinische Symptome einer Polyneuropathie, ein Patient (E.W.) wies außerdem noch ein Gangrän der linken Kleinzeh und eine Nephropathie auf. Das Durchschnittsalter betrug 37 Jahre,

Tab. 11 : Klinische Daten der diabetischen Patienten, die sich an der ambulanten Cross-over-Studie beteiligten

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Dauer des Diabetes (Jahre)	% ideales Körper- gewicht	Diabet. Komplikationen
I. B.	♀	29	14	100	R
N. D.	♂	49	10	113	R, Neu
M. G.	♀	58	29	102	R, Neu
E. H.	♂	38	13	100	R, Neu
E. K.	♀	22	11	108	-
A. L.	♂	27	10	94	R
A. S.	♂	38	7	107	-
E. W.	♂	41	24	111	R, Neu, N
X ± S.E.M.		37 ± 4	14,8 ± 2,7	104 ± 2	

R = Retinopathie, Neu = Neuropathie, N = Nephropathie

der jüngste Patient war 22 Jahre alt, der älteste 58. An den Aggregationsstudien nahmen nur 6 Diabetiker teil, da bei zwei Probanden (G.M. und D.N.) infolge technischer Schwierigkeiten kein Blut für diese Versuche zur Verfügung stand.

4.1.2 Kontrollpersonen

Für die 6 der 8 Typ I-Diabetiker, die an der Aggregationsstudie teilnahmen, wurde jeweils eine gesunde Kontrollperson mitgeführt, die in Geschlecht, Gewicht und Alter vergleichbar war (Tab. 12). Die Bestimmung von Aggregation und glykosyliertem Albumin wurde in denselben Zeitintervallen vorgenommen.

Kontrollperson	Geschlecht	Alter	% Idealgewicht	Kontrolle für
K.N.	weibl.	28	102	B.I.
M.I.	männl.	43	99	E.H.
S.B.	weibl.	23	98	E.K.
B.T.	männl.	27	88	L.A.
L.R.	männl.	43	92	A.S.
M.O.	männl.	43	110	E.W.

Tabelle 12:

Sämtliche Probanden wurden angehalten, eine Woche vor Beginn und während der Studie keine Medikamente einzunehmen, die Einfluß auf das Thrombozytenaggregationsverhalten zeigen, insbesondere keine Analgetika.

4.1.3 Versuchsablauf

Das Humaninsulin wurde von Dr. F. Einzmann (Eli Lilly und Company, Bad Homburg) zur Verfügung gestellt. Die Herstellung erfolgte durch Rekombinierung von A- und B.Ketten, die von genetisch modifizierten Stämmen von E. coli produziert worden waren. Die Konzentration betrug 40 U/ml bei einem pH von 7,3.

Es wurden 3 verschiedene Kombinationen von humanem regulärem mit humanem NPH-Insulin angewandt:

A (XA 2080 AMX) = 20 : 80 regular NPH

B (XA 2120 AMX) = 30 : 70 regular NPH

C (XA 2100 AMX) = 25 : 75 regular NPH

Das Schweineinsulin war ein hochgerinigtes, intermediär wirkendes Surfen-Insulin von Hoechst (Depot-Insulin CA; Ch. B. 098 W 079).

Die Diabetiker wurden in der Blutglukose-Selbstmessung mit Hilfe des Glukometers von Ames (Miles GmbH München) unterwiesen. Blutglukosewerte mußten während der fünfwöchigen ambulant durchgeführten Studie nüchtern, 1 Stunde nach dem Frühstück, vor dem Mittagessen, unmittelbar vor der zweiten Insulininjektion vor dem Abendessen und zwei Stunden nach dem Abendessen gemessen werden.

Jeden Samstag wurden in der Klinik Blutglukose-Profile erstellt und gleichzeitig nüchtern metabolische Parameter wie Lipide, HbA_{1c}, glykosyliertes Albumin, C-Peptid, Glukagon und Routine-Laborparameter bestimmt.

In Abb. 18 ist die Einteilung der 8 Patienten in 4 Subgruppen dargestellt. Human- oder Schweineinsulin wurden in der Cross-Over-Doppelblindstudie subcutan appliziert. Jedes Insulin wurde eine Woche lang, beginnend jeweils sonntags, in individueller Dosierung, aber konstant über den Versuchszeitraum 2 mal täglich injiziert. Der Injektions-Eß-Abstand betrug 30 Minuten.

Die Patienten - alle berufstätig - hatten ihr normalen

körperlichen Aktivitäten soweit möglich auch in der Klinik, und wurden gebeten, ihre individuell angepasste Diät strikt einzuhalten.

patient 1. 2. 3. 4. 5. week

A.S. E.W.	PREPHASE	A	C	B	D
I.B. A.L.		B	A	D	C
N.D. M.G.		C	D	A	B
E.K. E.H.		D	B	C	A

Abb. 18: In der Vorphase (Prephase) injizierten die Patienten hochgereinigte Schweineinsuline, die sie vor Beginn der Studie bereits applizierten (Kombination von regulären und intermediär wirkenden Insulinen). Die Humaninsuline A - C waren Mischungen aus regulären und NPH-Insulin im Verhältnis von A = 20:80, B = 30:70, C = 25:75; Insulin D ist Schweineinsulin Depot Insulin CS Hoechst.

4.2 Vergleich der Stoffwechselfparameter zwischen den einzelnen Versuchstagen

4.2.1 Alle Diabetiker

Zwischen den Versuchstagen V_1 - V_5 bestehen keinerlei signifikante Veränderungen bei allen gemessenen Laborparametern (Tab. 13).

n = 8	V ₁ MW±SEM	V ₂ MW±SEM	V ₃ MW±SEM	V ₄ MW±SEM	V ₅ MW±SEM
HMF	136,6±7,1	144,5±9,6	109,7±5,2	108,4±8,4	138,0±5,0
HbA ₁	10,2±0,6	10,4±0,7	10,2±0,7	9,8±0,6	9,7±0,6
Glucosex	198±28,9	247±19,5	171±17,6	180±25,9	213±14,6
Nü-Glucose	214±19,0	240±29,9	196±14,3	195±21,1	198±22,5
MBG	190±23,0	213±15,1	181±19,1	171±19,6	199±25,5
MAGE	82±10,1	115±16,6	74±7,8	81±7,3	77±17,5

Tabelle 13: Stoffwechselfparameter von 8 Diabetikern. Meßwerte von 5 Versuchstagen (MW±SEM).

4.2.2 Alle Normalpersonen

Den Normalpersonen wurde nur an den Versuchstagen V₁, V₃, und V₅ Blut zur Untersuchung abgenommen.

An den drei Versuchstagen waren glykosyliertes Albumin (HMF) und Glucose konstant (Tab. 14). Das HbA₁ wurde nur in V₁ bestimmt.

n = 6	V ₁ MW±SEM	V ₃ MW±SEM	V ₅ MW±SEM
HMF	97,7 ± 4,5	9,5 ± 6,5	100,3 ± 1,9
HbA ₁	6,3 ± 0,1	-	-
Glucose	88,2 ± 2,6	91,5 ± 7,7	89,2 ± 4,4

Tabelle 14: Werte (MW±SEM) der Normalpersonen (n=6).

4.2.3 Vergleich der Stoffwechselfparameter zwischen Diabetikern und Normalpersonen

Beim Vergleich des glykolisierten Albumins zwischen Normalpersonen ($99,0 \pm 2,6$ MW $\pm$ SEM) und Diabetikern ($124 \pm 4,6$ MW $\pm$ SEM) besteht eine statistisch signifikante Erhöhung ($p < 0,0005$) bei den Diabetikern. Ebenso verhält es sich bei den MW für HbA₁ (NP: $6,3 \% \pm 0,1$: Diab. $10,1 \% \pm 0,6$) und der Gesamtglukose (NP: $90 \pm 4,0$: Diab. $202 \pm 13,7$), wobei beide Werte der Diabetiker eine statistisch signifikante Erhöhung ($p < 0,00005$) gegenüber den Normalpersonen zeigen (Tab. 15).

	Normalpers. n=6 MW $\pm$ SEM	Diabetiker n=8 MW $\pm$ SEM
H M F	$99,0 \pm 2,6$	$p < 0,0005$ $125 \pm 4,6$
HbA ₁	$6,3 \% \pm 0,1$	$p < 0,00005$ $10,1 \% \pm 0,6$
Glucose x	$90 \pm 4,0$	$p < 0,00005$ $202 \pm 13,7$

Tabelle 15: Stoffwechselfparameter der Diabetiker (n=8) und gesunder Vergleichspersonen (n=6). MW $\pm$ SEM von 5 Untersuchungen bei Diabetikern bzw. 3 Untersuchungen bei Kontrollpersonen an unterschiedlichen Tagen pro Person.

4.2.4 Weitere Laborparameter

Die in Tab. 16 aufgeführten Laborwerte liegen alle im Normbereich und zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen mit Schweine- oder Humaninsulin behandelten Diabetikern. Es handelt sich hier um Mittelwerte mit Standardabweichung von 8 diabetischen Patienten, die im Laufe der 5 Versuchstagen 2 Wochen mit Schweineinsulin und 3 Wochen mit Humaninsulin behandelt wurden.

Parameter	Schweine- insulin	Humaninsulin
platelets $\times 10^3$	190 $\pm$ 18	209 $\pm$ 15
leucocytes $\times 10^3$	6.7 $\pm$ 0.1	6.6 $\pm$ 0.3
erythrocytes $\times 10^3$	4.8 $\pm$ 0.1	4.6 $\pm$ 0.1
hemoglobin (g/dl)	15.2 $\pm$ 0.2	14.5 $\pm$ 0.1
hematocrit (%)	45 $\pm$ 1	46 $\pm$ 1
Na ⁺ (mval/L)	139 $\pm$ 1	137 $\pm$ 1
K ⁺ (mval/L)	4.3 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.1
Ca ²⁺ (mval/L)	4.8 $\pm$ 0.1	4.7 $\pm$ 0.1
phosphate (mg/dl)	3.9 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 0.2
uric acid (mg/dl)	4.0 $\pm$ 0.3	3.7 $\pm$ 0.3
creatinine (mg/dl)	0.9 $\pm$ 0.03	0.8 $\pm$ 0.06
alkaline phosphatase (U/L)	100 $\pm$ 12	117 $\pm$ 7
GOT (U/L)	11 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1
GPT (U/L)	11 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1
GGT (U/L)	13 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1
serum protein (g/dl)	6.7 $\pm$ 0.4	6.0 $\pm$ 0.6
triglycerides (mg/dl)	83 $\pm$ 14	92 $\pm$ 12
cholesterol (mg/dl)	248 $\pm$ 10	240 $\pm$ 9
HDL cholesterol (mg/dl)	60 $\pm$ 8	56 $\pm$ 6

Tab. 16: Laborparameter Diabetiker unter Human- und Schweineinsulintherapie (n=8).

4.3 Das Verhalten der Stoffwechselfparameter unter Humainsulin und Schweineinsulin

4.3.1 H b A₁

Abb. 19 zeigt den mittleren HbA₁-Spiegel, der sich während der verschiedenen Insulintherapie nicht änderte. Auch das labile HbA₁ zeigte lediglich in der Vorphase der Untersuchungen, in der alle Patienten mit verschiedenen Schweineinsulinpräparaten eingestellt waren, einen niedrigeren Wert, der jedoch nicht signifikant war.

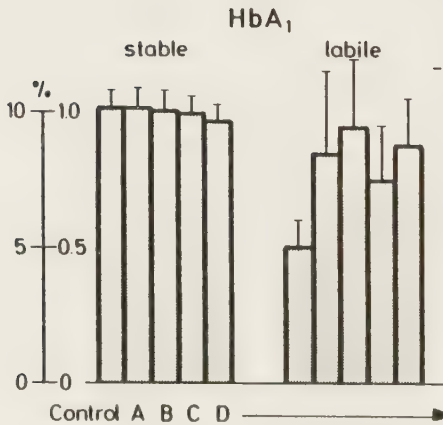


Abb. 19: Glykosyliertes Hämoglobin, gemessen am Ende jeder Testwoche (n = 8).

4.3.2 Glykosyliertes Albumin

Wie Abb. 19 zeigt, ist das glykosylierte Albumin der 8 diabetischen Patienten sowohl während der Behandlung mit Schweineinsulin (entspricht in Abb. dem Buchstaben d), als auch während der Behandlung mit Humaninsulin 25 : 75 regular : NPH (entspricht in Abb. 20 dem Buchstaben C) statistisch signifikant ($p < 0,05$) gegenüber der Vorphase erniedrigt.

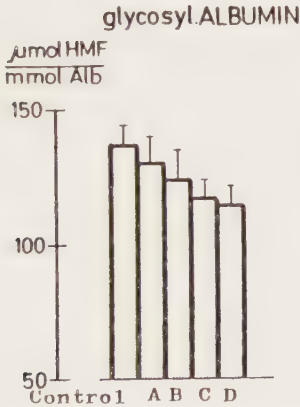


Abb. 20: Glykolysiertes Albumin, gemessen am Ende jeder Testwoche ($n = 8$).

4.3.3 Mittlere Tagesblutglukose, Nüchternblutglukose und Mage

Aus Abb. 21 geht hervor, daß die mittlere Tagesblutglukose und die Nüchternblutglukose unter den verschiedenen Insulintherapien keine statistisch signifikanten Unterschiede zeigen. Ebenso verhält sich das Mage, ein Wert für die Stabilität des Glucosestoffwechsels, das im Verlauf der 5-wöchigen Untersuchungen keinerlei signifikante Unterschiede aufweist.

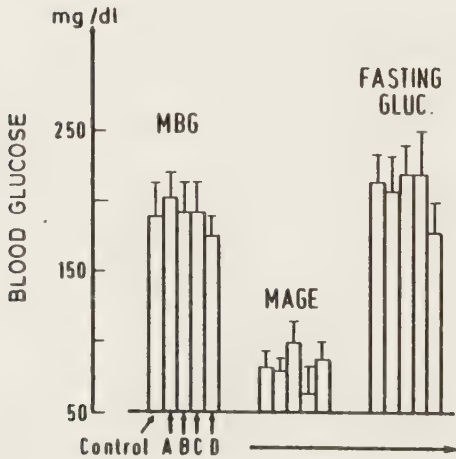


Abb. 21: Nüchternblutglukose, mittlere Tagesblutglukose (MBG) und mittlere Amplitude der Blutglukoseschwankungen (MAGE), gemessen bei 8 Diabetikern (n = 8), am Ende jeder Testwoche.

4.4 Thrombozytenaggregation

4.4.1 Diabetiker

Allgemein läßt sich eine Zunahme der Aggregationsprozente von der ersten bis zur fünften Untersuchung beobachten, wobei bei den jeweils höheren Konzentrationen von ADP ($2,5 \mu\text{M/l}$) und Kollagen ($1,25 \mu\text{M/l}$) eine statistische Signifikanz zu V_3 mit $p < 0,05$ festzustellen ist (für ADP $2,5 \mu\text{M/l}$), bzw. zu V_1 mit $p < 0,025$ (Kollagen $1,25 \mu\text{g/l}$). Bei der Spontanaggregation finden sich zu Beginn im Mittel $9 \pm 2,2 \%$, dann folgt ein leichtes Absinken auf $7 \pm 1,1 \%$, und bei der fünften Untersuchung findet sich der höchste Wert mit $10 \pm 1,9$, der jedoch ebenso wie die anderen Werte statistisch nicht signifikant ist (Tab. 17).

Aggregantien	V_1	V_3	V_5
ADP $1,25 \mu\text{M/l}$ $2,5 \mu\text{M/l}$	44 ± 4	40 ± 3	$56 \pm 6^*$
	30 ± 4	31 ± 2	46 ± 8
Koll $0,625 \mu\text{M/l}$ $1,25 \mu\text{M/l}$	40 ± 5	48 ± 2	55 ± 8
	46 ± 5	55 ± 3	$61 \pm 4^{++}$
AA $300 \mu\text{M/l}$ $500 \mu\text{M/l}$	22 ± 9	28 ± 9	39 ± 13
	30 ± 10	47 ± 3	46 ± 10
Spontan A %	9 ± 2	7 ± 1	10 ± 2

Tabelle 17: Aggregationswerte (Zunahme der Lichttransmission in %) der Diabetiker ($n = 6$) in $\text{MW} \pm \text{SEM}$.

*: $p < 0,05$ im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung

++: $p < 0,025$ im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung

4.4.2 Normalpersonen

Bei den sechs gesunden Kontrollpersonen zeigen sich unterschiedliche Schwankungen zwischen den Mittelwerten der einzelnen Versuchstagen (Tab. 18). Für ADP $1,25 \mu\text{M/l}$ findet sich eine mit $p < 0,025$ statistisch signifikante Abnahme der induzierten Aggregation am dritten Untersuchungstag gegenüber dem zweiten Untersuchungstag. Weiterhin fällt eine mit $p < 0,025$ statistisch signifikante Abnahme der mit $300 \mu\text{g/ml}$ induzierten Aggregation am dritten gegenüber dem ersten Untersuchungstag auf. Die mit $0,625 \mu\text{g/ml}$ Kollagen induzierte Aggregation zeigt dagegen eine kontinuierliche Abnahme im Laufe der einzelnen Untersuchungstage von $35 \pm 8,8$ über $30 \pm 8,4$ auf $24 \pm 9,6$ Prozent, die jedoch nicht statistisch signifikant ist. Ebenso verhalten sich alle übrigen gemessenen Aggregationsparameter, die keinerlei statistische Signifikanz aufweisen.

Die Spontanaggregation zeigt sich mit $5 \pm 0,7 \%$ zu Beginn, $3 \pm 1,1 \%$ am zweiten und $4 \pm 1,4 \%$ am dritten Untersuchungstag ein konstantes Verhalten.

Aggregantien	V ₁	V ₃	V ₅
2,5µM/1 ADP	39 ± 3,9	44 ± 2,8	40 ± 4,4
1,25µM/1	27 ± 4,0	35 ± 2,7	25 ± 2,8 ^{**}
0,625µg/1 Koll	35 ± 8,8	30 ± 8,4	24 ± 9,6
1,25µg/1	55 ± 7,2	48 ± 10,3	55 ± 2,8
300µg/1 AA	33 ± 11,4	14 ± 12,8	5 ± 3,7 ⁺⁺
500µg/1	37 ± 9,5	23 ± 13,4	40 ± 12,0
Spontane A %	5 ± 0,7	3 ± 1,1	4 ± 1,4

Tabelle 18: Vergleich der einzelnen Untersuchungen bei Normalpersonen (n = 6)
^{**}: p<0,025 im Vergleich zur vorhergehenden Untersuchung
⁺⁺: p<0,025 im Vergleich zur ersten Untersuchung

4.4.3 Einfluß der Therapie mit verschiedenen Insulinen auf die Thrombozytenaggregation

Vergleicht man die Mittelwerte der Aggregationsprozente in Tabelle 19 bei Diabetikern unter Humaninsulintherapie (A+B+C gemittelt), so findet sich bei der Humaninsulintherapie eine Zunahme der Aggregation induziert durch Kollagen 0,625 µg/ml und 0,25 µg/ml und durch Arachidonsäure 500 µg/ml mit jeweils einer statistischen Signifikanz von p<0,05. Beim Vergleich zwischen mit Humaninsulin C und Schweineinsulin behandelten Patienten zeigt sich eine statistische Signifikanz von p<0,05 bei der Thrombozytenaggregation mit Kollagen 0,625 µg/ml und 1,25 µg/ml auf, während die induzierte Aggregation mit 500 µg/ml Arachidonsäure mit p<0,025 statistisch ebenfalls signifikant

ist. Beim Vergleich aller übrigen Werte zeigt sich keine statistische Signifikanz (Tabelle 19).

Aggregantien	Schwein	Human insgesamt	Human A	Human C
ADP 2,5µM/l	30 ± 4	39 ± 5	41 ± 12	43 ± 9
1,25µM/l	44 ± 4	48 ± 5	53 ± 10	49 ± 7
Koll 0,625µg/ml	41 ± 5	54 ± 3 [*]	56 ± 4	58 ± 4 ⁺⁺
1,25µg/ml	49 ± 4	59 ± 3 [*]	53 ± 5	64 ± 2 ⁺⁺
AA 300µg/ml	22 ± 10	33 ± 8	20 ± 12	46 ± 15
500µg/ml	31 ± 10	51 ± 3 [*]	48 ± 3	56 ± 2 ⁺
Spontane A %	8 ± 2	9 ± 3	10 ± 3	8 ± 1

Tabelle 19: Vergleich der verschiedenen Insuline untereinander (n = 8) in MW±SEM.

*: p<0,05 im Vergleich zwischen Schweineinsulin und Humaninsulin insgesamt

+: p<0,05

++: p<0,025 im Vergleich zwischen Schweineinsulin und Humaninsulin C.

4.4.4 Thrombozytenaggregation unter der Therapie mit verschiedenen Humaninsulinen und Schweineinsulin im Vergleich mit Normalpersonen

Vergleicht man die Mittelwerte der durch Kollagen 0,625 µg/ml und Arachidonsäure 500 µg/ml induzierten Thrombozytenaggregation, so fällt auf, daß die mit Humainsulin A, Humaninsulin C behandelten Patienten statistisch hoch

signifikante Werte gegenüber den Normalpersonen aufweisen. Ebenso verhält es sich bei dem Vergleich aller mit Humaninsulin (Human A + B + C) behandelten Patienten gegenüber den Normalpersonen (Tab. 20). Auch die Spontanaggregation ist bei Human insgesamt und Human C statistisch hoch signifikant. Vergleicht man Humaninsulin A mit Humaninsulin C, fällt bei der hohen Dosierung des Kollagens und der mit Arachidonsäure 500 µg/ml induzierten Aggregation eine statistische Signifikanz von $p < 0,05$ auf. Auch die Spontanaggregation unter Human A ist mit $p < 0,025$ statistisch

Aggregantien	Normal- personen n = 6 MW±SEM	Schwein n = 6 MW±SEM	Human insgesamt n = 6 MW±SEM	Human A n = 4 MW±SEM	Human C n = 4 MW±SEM
ADP 1,25µM/l	41±3,0	44±3,9	48±4,9	53±10,1	49±7,0
2,5µM/l	29±2,7	30±3,5	39±5,0	41±12,0	43±9,0
Koll 0,625µg/ml	29±6,6	41±5,2	**** 54±3,0	*** 56±4,5	*** 58±4,0
1,25µg/ml	53±6,0	49±4,1	59±2,5	53±5,0	+ 64±2,0
AA 300µg/ml	17±3,6	22±9,9	33±8,6	20±11,5	46±15,4
500µg/ml	30±3,9	31±10,2	**** 51±2,8	*** 48±3,0	****+ 56±2,5
Spontane A	4±0,8	8±1,8	**** 9,0±1,0	** 10±3,2	**** 8±1,0

Tabelle 20: Vergleich der verschiedenen Insuline mit Normalpersonen.
 *: Vergleich mit Normalpersonen
 *: $p < 0,05$
 **: $p < 0,025$
 ***: $p < 0,01$
 ****: $p < 0,005$
 +: Vergleich Human A : Human C,
 $p < 0,05$.
 Human insgesamt = Humaninsulin A + B + C1

signifikant gegenüber den Normalpersonen. Alle übrigen Werte, sowie auch die Unter Schweineinsulintherapie gemessenen Werte ($MW \pm SEM$) zeigen keine statistische Signifikanz gegenüber den Normalpersonen (Tab. 20).

4.4.5 Arachidonsäure induzierte Aggregation bei Normalpersonen und bei Diabetikern

Bei Thrombozytenaggregationsinduzierung mit 300 oder 500 $\mu g/ml$ Arachidonsäure (AA) fiel deutlich eine Alles oder Nichts Reaktion auf, wobei sich bei eingetretener Aggregation kein Unterschied in dem Ausmaß der Aggregation zeigte. Wie Tabelle 21 zeigt, trat bei der Gruppe der Normalpersonen nur in 42 % der durchgeführten Messungen eine Aggregation nach Zugabe von AA ein, im Gegensatz dazu zeigte sich bei 72 % der Diabetiker eine Aggregation. Bei der mit 300 $\mu g/ml$ induzierten Thrombozytenaggregation zeigten 28 % der Normalpersonen gegenüber 61 % der Diabetiker eine positive Reaktion. Wurde mit 500 $\mu g/ml$ AA die Thrombozytenaggregation induziert, so zeigten 58 % von den Normalpersonen und 83 % der Diabetiker eine positive Aggregation. Jedoch zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich des

	Normalpers. n=6	Diabetiker n=6
AA insgesamt	42 % (36)	72 % (36)
AA 300 $\mu g/ml$	28 % (18)	61 % (18)
AA 500 $\mu g/ml$	58 % (18)	83 % (18)

Tabelle 21: Arachidonsäure-induzierte Aggregation. Angegeben sind die Prozente der aufgetretenen Aggregation bezogen auf die Zahl der in total durchgeführten Experimente (Zahlen in Klammern)

Ausmaßes der Aggregation zwischen beiden Arachidonsäurekonzentrationen. Ob nun mit 300 µg/ml oder 500 µg/ml die Thrombozytenaggregation induziert wurde, es zeigte sich jedes Mal derselbe Aggregationswert gemessen als % pos. Agg/Total exp.

5. DISKUSSION

5.1 Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation von verschiedenen Faktoren

Zwar gibt es eine große Anzahl von Untersuchungen über eine veränderte Thrombozytenaggregation in vitro bei verschiedenen Krankheitsbildern wie Diabetes mellitus Arteriosklerose oder Hyperlipoproteinämie, doch wird ihr Aussagewert häufig dadurch beschränkt, daß verschiedene Faktoren, die das Aggregationsverhalten der Thrombozyten beeinflussen, unbeachtet bleiben.

Unsere Versuche zeigten, daß die Bedeutung von Aufbewahrungstemperatur des plättchenreichen Plasmas, Zeitintervall nach Blutabnahme und Aggregationsdosis zum Erhalt sinnvoller Ergebnisse berücksichtigt werden sollte.

Der wichtigste Faktor ist die verwendete Aggregantiendosis. Eine genaue Austestung zum Erhalt submaximaler Dosen ist erforderlich, da nur mit diesen Aggregantienkonzentrationen die Erkennung einer eventuell erhöhten Aggregationsneigung möglich ist.

In unseren Versuchen mit steigenden Aggregantiendosen waren ADP 2,5 $\mu\text{M/l}$ und Kollagen 1,25 $\mu\text{M/l}$ in der Lage, bei allen Probanden auch den Normalpersonen eine Maximalaggregation auszulösen. Bei den beiden niedrigsten zur Aggregationsinduzierung ausreichenden Dosen (0,625 $\mu\text{M/l}$ ADP und 0,625 $\mu\text{M/l}$ Kollagen) ließ sich in vielen Fällen eine Desaggregation beobachten.

Diese Resultate stehen im Einklang mit den Ergebnissen von ARDLIE und HAN [2], die bei Normalpersonen mit ADP-Konzentrationen ähnliche Aggregationskurven registrierten. Auch SCHÄFER [100] fand ab 5 $\mu\text{M/l}$ ADP eine Maximalaggregation. SIESS [105] konnte eine vergleichbare Dosisabhängigkeit für Kollagen aufzeigen. Die erhaltenen Aggrega-

tionswerte nach maximaler Stimulation mit ADP und Kollagen stimmen mit unseren Ergebnissen bei Normalpersonen überein.

Hinsichtlich dieser Resultate lassen sich die Befunde einiger Autoren erklären, die keine Unterschiede der Thrombozytenaggregation zwischen Diabetikern und Normalpersonen feststellen konnten. PORTA [90] erhielt nach Induzierung mit 10 $\mu\text{M/l}$ ADP sowie 1 mg/ml Kollagen identische Resultate bei Diabetikern und Normalpersonen. Durch die etwa 100-fach höhere Kollagen- und doppelte ADP-Dosis war hier das Erkennen eines veränderten Schwellenverhaltens nicht möglich.

Auf derselben Ursache könnten auch die Resultate von DUPUY [32] und FRITSCHI [44] beruhen, die bei ihren Untersuchungen eine Kollagenkonzentration von 8 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 6,25 $\mu\text{g/ml}$ und 25 $\mu\text{g/ml}$ einsetzten.

Unsere Untersuchungen zu der Zeitabhängigkeit der Aggregation führten zu dem Ergebnis, daß ab 90 Minuten nach Venenpunktion mit einer abnehmenden Aggregationsneigung zu rechnen ist, die bei Verwendung von ADP und Kollagen zwischen 5 % und 8 % pro Stunde liegt.

Von ähnlichen Ergebnissen berichten WARLOW et al. [111], die eine Reduzierung der ADP- und Kollagen-induzierten Aggregation und der "second phase"-Kurve bei Adrenalinzugabe nachweisen konnten.

Im Gegensatz dazu stehen die Informationen von BREDDIN [11]; er fand eine zunehmende Aggregationstendenz der Thrombozyten bis 120 Minuten nach Blutabnahme, die bei niedrigeren Dosen ADP und Kollagen ausgeprägter war. Danach findet sich entweder Stagnation (ADP) oder Rückgang der Aggregation (Kollagen).

Verschiedene Ursachen werden als Erklärung des veränderten Aggregationsverhaltens diskutiert: WARLOW [111] vermutet eine Konzentrationsänderung der ADP-abbauenden Plasmaen-

zyme, BREDDIN [11] macht Änderungen der Membranpermeabilität und "irritierte" Plättchenformen dafür verantwortlich. Denkbar wäre auch eine Änderung des Plasma-pH während der Aufbewahrung des PRP₂ [12].

Der Einfluß der Temperatur auf Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten ist seit langem bekannt. Abkühlung und anschließende kurze Wiederaufwärmung wirken allein aggregationsauslösend [61, 87], lokale Reizung mit Eis kann sogar bei intaktem Gefäßendothel eine Thrombozytenadhäsion bewirken [74]. Wärme dagegen führt zu Funktionsverlust der Plättchen; bei Aufbewahrung von PRP₂ bei 37°C fand BREDDIN [11] eine ausgeprägte Reduzierung der ADP- und Kollagen-induzierten Aggregation.

In unseren Versuchen konnten wir diese Beobachtungen bestätigen: Aufbewahrung bei 37°C führte zu rascherer Aggregationsfähigkeit als bei Raumtemperatur. Diejenigen Proben, die in Eis gelagert waren, zeigten die höchsten Aggregationswerte.

Geht man nun von diesen Beobachtungen aus, so lassen sich die Ergebnisse von PORTA 91[, der bei Diabetikern eine normale Aggregation beschreibt, vielleicht damit erklären, daß die Aufbewahrung des PRP₂ bei 37°C erfolgte, wobei über das Zeitintervall zwischen Blutabnahme und Versuchsbeginn keine Angaben zu finden sind.

Als weitere Faktoren, die bei Gesunden eine Steigerung der Aggregation bewirken, werden Rauchen, Streß, physische und psychische Belastung angesehen [48].

HAWKINS [49] konnte eine verstärkte Aggregationstendenz bei Rauchern nachweisen, die am deutlichsten unmittelbar nach dem Rauchen einer Zigarette auftrat.

Da 50 % der Normalpersonen der Cross-over-Studie Raucher waren, wäre damit eine Erklärung gegeben für die Schwankungen der Aggregationswerte, die zwischen den einzelnen Versuchstagen auftraten (Tab. 18).

5.2 Glykosyliertes Albumin

Die Werte des glykosylierten Albumins lagen in unseren Versuchen im Mittel signifikant höher als bei Normalpersonen und korrelierten gut mit glykosyliertem Hämoglobin ($p < 0,0005$) und Blutglukosekonzentration ($p < 0,0005$). Diese Resultate sind vergleichbar mit den Befunden von DOLHOFFER und WIELAND [30], die mit der Thiobarbitursäuremethode ebenfalls erhöhte GSA-Werte bei Diabetikern nachweisen konnten. Auch KENNEDY et al. [62, 63] berichten über eine verstärkte Glykosylierung von Albumin und Gesamtproteinen bei diabetischen Patienten; sie konnten zudem ein gleichsinniges Verhalten der beiden Parameter während verbesserter Kontrolle beobachten.

Bei der von uns durchgeführten fünfmaligen Bestimmung der Stoffwechselfparameter in wöchentlichem Abstand blieben die HbA_1 -Werte unverändert, während die Werte des glykosylierten Albumins Schwankungen zwischen 108,4 und 144,6 aufzeigten, die zu den Veränderungen von Nüchternblutglukose und noch ausgeprägter, mit der mittleren Blutglukose zwischen den jeweiligen Versuchstagen, ein gleichsinniges Verhalten zeigten.

Dies legt die Bedeutung des glykosylierten Albumins (GSA) als sensitiven Indikator zur mittelfristigen Objektivierung der Diabeteskontrolle nahe. Auch JONES und Mitarbeiter [57] zeigten in einer Studie mit 12 neu entdeckten diabetischen Patienten, daß nach vierwöchiger Behandlung mit Insulin eine signifikant geringere Abnahme von HbA_1 im Vergleich zur Nüchternblutglukose und glykosyliertem Albumin zu messen war. Nach vier weiteren Wochen war kein Unterschied mehr in der prozentualen Reduzierung der drei Kontrollparameter zu sehen.

Diese Befunde verdeutlichen, daß HbA_1 und glykosyliertes Albumin zeitlich verschiedene Aspekte und Glucoseintoleranz zeigen. In diesem Sinne dient HbA_1 eher als Langzeit-, - das glykosylierte Albumin eher als Kurzzeitkontrolle,

entsprechend der Lebensdauer der Erythrozyten von 120 Tagen und der Albuminhalbwertszeit von 17 Tagen [93]. Zudem ist die Glykosylierungsrate von Albumin wesentlich schneller als die von HbA₁; schon nach 4 - 5 Tagen läßt sich eine Erhöhung durch veränderte Glucosespiegel feststellen, während beim HbA₁ eine Antwort erst nach 17 Tagen möglich ist [29].

5.3 Einfluß von Humaninsulin und Schweineinsulin auf die Thrombozytenaggregation

In unseren Untersuchungen zur Thrombozytenaggregation fand sich zwischen Kontrollpersonen und Diabetikern mit Schweineinsulintherapie kein Unterschied der Aggregationswerte bei Induzierung mit ADP, Kollagen und Arachidonsäure trotz der "schlechten" Stoffwechseleinstellung der Diabetiker. Lediglich die Spontanaggregation war mit $p < 0,05$ signifikant stärker beim Diabetiker ausgeprägt. Dagegen zeigte sich eine deutlich höhere Aggregationstendenz bei Diabetikern unter der Therapie mit BHI; die Resultate lagen bei Induzierung mit 0,625 µg/ml Kollagen und 500 µg/ml Arachidonsäure statistisch hoch signifikant über den Kontrollwerten, ebenso die Spontanaggregation (Tab. 19).

Dieses Ergebnis einer stärker ausgeprägten Thrombozytenreaktivität unter Humaninsulintherapie, verglichen mit konventioneller Therapie durch hochgereinigtes Schweineinsulin wirkt überraschend. Zwar sind unterschiedliche Stoffwechseleffekte der beiden Insulinspezies bekannt, sie würden jedoch eher eine verminderte Aggregationstendenz unter biosynthetischem Humaninsulin erwarten lassen.

SCHÖFFLING [104] berichtet von einem schwächeren Adrenalin-Anstieg und einem völligen Ausbleiben der Prolaktinsekretion im Hypoglykämietest mit Humaninsulin an gesunden Probanden.

SCHLÜTER [103] konnte eine schwächere hormonelle Gegenreaktion mit verminderter Cortisolausschüttung im gleichen Testverfahren nachweisen.

Glykosyliertes Albumin lag in unseren Versuchen in der Phase der Schweineinsulintherapie mit $138 \pm 8,3 \text{ MW} \pm \text{SEM}$ ($p < 0,05$) höher als unter Humaninsulin mit $121 \pm 7,0 \text{ MW} \pm \text{SEM}$ ($p < 0,05$). Daraus ließe sich auf eine verbesserte Stoffwechselsituation unter Humaninsulin schließen, da dieser Parameter Blutzuckeränderungen schon nach einer Woche reflektiert [29].

DEMMELE [27] konnte in Untersuchungen mit Typ I Diabetikern nachweisen, daß sich bei verbesserter Einstellung (Abfall des HbA_1 von 14,5 auf 10,9) die ADP-Schwellenkonzentration erniedrigte und somit die Reaktivität der Thrombozyten zunahm.

JACKSON fand bei 11 Diabetikern nach 16-wöchiger Therapie mit kontinuierlicher subkutaner Insulininfusion [55], die eine fast normoglykämische Einstellung bewirkte, eine erhöhte Plättchenaktivität nach ADP-Zugabe und eine unveränderte Antwort auf Kollagen- und Na-Arachidonat im Vergleich zu den Anfangswerten.

Die zuletzt zitierten Beobachtungen wurden damit erklärt, daß bei Einstellungsverbesserung auch die metabolische Situation der Thrombozyten günstiger wird.

Andere korpuskuläre Blutelemente zeigen bei stärkerer Hyperglykämie ebenfalls veränderte Funktionen: bei polymorphkernigen Leukozyten fand sich eine Abnahme der Adhäsion, der Phagozytose und der Chemotaxis; Neutrophile zeigten verstärkt Glykolyse und Myeloperoxidasemangel vom Alius Grignaschi Typ [58]. Diese Störungen waren bei verbesserter Stoffwechselsituation weitgehend reversibel. Somit ließe sich die verstärkte Thrombozytenaggregation unter Therapie mit biosynthetischem Humaninsulin als Ausdruck einer verbesserten Stoffwechselsituation interpretieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde versucht, eine Antwort auf die Frage zu finden, inwieweit das Humanalbumin Vor- oder Nachteile gegenüber dem herkömmlichen Schweineinsulin bezüglich der Thrombozytenaggregation und Stoffwechseleinstellung bei Diabetikern zeigt. Die Stoffwechseleinstellung auf längere Sicht rückwirkend gesehen wurde durch das HbA_1 und das glykosylierte Albumin kontrolliert.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Faktoren untersucht, die die Thrombozytenaggregation in vitro bei Gesunden beeinflussen. Dabei zeigte sich, daß die Plättchenreaktivität bei steigender Temperatur und zunehmendem Thrombozytenalter abnimmt und entscheidend von der Konzentration der zugegebenen Agregantien abhängt. Weiterhin fand sich eine lineare Zunahme der Lichttransmission bei steigender Thrombozytenkonzentration. Veränderungen in der Blutabnahmetechnik sowie Probengewinnung von nüchternen Probanden im Gegensatz zu postprandialer Punktion resultieren ebenfalls in gesteigerter Thrombozytensensibilität.

Der zweite Teil zeigt die Entwicklung einer Methode zur Messung der glykosylierten Albumine und Serumproteine. Hierbei wurde versucht, eine möglichst optimale Meßmethode auszuarbeiten. Bei Vorversuchen zur Messung der Serumspiegel glykosylierten Albumins fand sich bei der Affinitätschromatographischen Abtrennung des Albumins eine Abhängigkeit sowohl vom pH als auch von der NaCl-Konzentration des Elutionspuffers, und es konnte ein verändertes Elutionsprofil des glykosylierten Albumins im Vergleich zu nicht glykosyliertem nachgewiesen werden. Die Bildung des Reaktionsendproduktes 5 - Hydroxymethylfurfural erwies sich als linear abhängig von der Albuminkonzentration der Proben.

Bezüglich des Zusammenhangs zwischen glykosyliertem Serumalbumin (GSA) und HbA_1 ließ sich eine signifikante Korre-

lation nachweisen, ebenso zwischen GSA und der Serumglukosekonzentration.

Im dritten Teil der Arbeit wurde in einer 5-wöchigen Studie mit 8 Diabetikern und 6 Kontrollpersonen untersucht, ob sich bei Therapie mit Humaninsulin gegenüber Schweineinsulin Unterschiede in der Stoffwechseleinstellung feststellen lassen. Dabei lagen die Werte des glykosylierten Albumins im Mittel signifikant höher als bei den Normalpersonen und korrelierten gut mit glykosyliertem Hämoglobin und der Blutglukosekonzentration. Bei der 5-maligen Bestimmung im wöchentlichen Abstand bleiben die HbA_1 -Werte unverändert, während die Werte des glykosylierten Albumins Schwankungen zeigten, die zu den Veränderungen der Nüchternblutglukose und der mittleren Blutglukose ein gleichsinniges Verhältnis zeigten.

Die Thrombozytenaggregation zeigte zwischen Kontrollpersonen und Diabetikern unter Schweineinsulintherapie keinen Unterschied der Aggregationswerte bei Induzierung mit ADP, Kollagen und Arachidonsäure. Dagegen zeigte sich eine deutlich erhöhte Aggregationstendenz bei Diabetikern unter Therapie mit Humaninsulin (BHI).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] AGARWAL K, PARKS R, WIDNESS J, SCHWARTZ R:
Nonenzymatic glycosylation of erythrocytic proteins
in normal and diabetic subjects. *Diabetes* 34 (1985)
251-255

- [2] ARDLIE N, HAN P: Enzymatic Basis for Platelet
Aggregation and Release: The significance of the
"Platelet Atmosphere" and the relationship between
platelet function and blood coagulation. *British
Journal of Haematology* 26 (1974) 331-356

- [3] BAILEY A, ROBINS S, TANNER M: Reducible components
in the proteins of human erythrocyte membrane.
Biochem. Biophys. Acta 343 (1976) 51-57

- [4] BENSOUSSAN D, LEVY-TOLEDANOS S, PASSA P, CAEN J,
CANIVET J: Platelet hyperaggregation and increased
plasma level of Von Willebrand factor in diabetes
with retinopathy. *Diabetologia* 11 (1975) 307-312

- [5] BERKMAN J, RIFKIN H, ROSS G: The serum poly-
saccharides in diabetic patients with and without
degenerativ vascular disease. *J. Clin. Invest.* 32
(1953) 415-421

- [6] BERN M: Platelet functions in diabetes mellitus.
Diabetes 27 (1978) 342-349

- [7] BETTERIDGE D, ZAHAVI J, JONES N, SHINE B, KAKKAR V,
GALTON D: Platelet function in diabetes mellitus in
relationship to complications, glycosylated haemo-
globin and serum lipoproteins. *Europ. J. Clin.
Invest.* 11 (1981) 273-277

- [8] BIERRY H, RATHERY F: Diabète et Glycémie.
C.R. Acad. Sci. 172 (1921) 244-246

- [9] BORN G, FEINBERG H: Binding of adenosine diphosphate to intact human platelets. J. Physiol. 251 (1975) 803-816
- [10] BORN G: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature 4832 (1962) 927-929
- [11] BREDDIN K, ZIEMEN M, BAUER O, HERRMANN W, SCHANDINN L, SCHLOSSER U, WINTERHAGEN A, KRZYWANIEK H: Time and temperature dependant changes of ADP - and Collagen - induced and "spontaneous" Aggregations. Thrombosis Research 19 (1980) 621-638
- [12] BREDDIN K, GRUN H, KRZYWANIEK H, SCHREMMER W: On the measurement of spontaneous platelet aggregation. The platelet aggregation test III. Thrombos. Hämostas. (Stuttgart) 35 (1976) 669-691
- [13] BUNN H, HIGGINS P: Reaction of monosaccharides with proteins: Possible evolutionary significance. Science 213 (1981) 222-224
- [14] BUNN H: Non-enzymatic glycosylation of protein: a form of molecular aging. Schweiz. Med. Wochenschrift 111 (1981) 1503-1507
- [15] BUNN H: Nonenzymatic glycosylation of protein: Relevance to diabetes. Amer. J. Med. 70 (1981) 325-300
- [16] BUNN H, HANEY D, KAMIN S, GABBAY K, GALLOP P: The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}. Slow glycosylation of hemoglobin in vivo. J. Clin. Invest. 57 (1976) 1652-1659

- [17] BUNN H, HANEY D, GABBAY K, GALLOP P: Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A_{1c}. Biochem. Biophys. Res. Com. 67 (1975) 103-109
- [18] CAHILL G, ETZWILER D, FREINKEL N: "Control and Diabetes". New. Engl. J. Med. 294 (1976) 1004-1005
- [19] CERIELLO A, CURCIO F, DELLO RUSSO P, GUIGLIANO D: Non-enzymatic glycosylation reduces antithrombin III activity. Thromb. Haemostas. 52 (1984) 363-369
- [20] COHEN M, URDANIVIA E, SURMA M, CIBOROWSKI C: Non-enzymatic glycosylation of basement membranes. Diabetes 30 (1981) 367-371
- [21] COLWELL J, NAIR R, HALUSHKA P, ROBERS C, WHETSELL A, SAGEL J: Platelet adhesion and aggregation in diabetes mellitus. Metabolism 28 (Suppl. 1) (1979) 394-400
- [22] COLWELL J, SAGEL J, CROOK L, CHAMBERS A, LAIMINS M: Correlation of platelet aggregation, plasma factor activity and megathrombocytes in diabetic subjects with and without vascular disease. Metabolism 26 (1977) 279-285
- [23] COLWELL J, HALUSHKA P, SARJI K, LEVINE J, SAGEL J, NAIR R: Altered platelet function in diabetes mellitus. Diab. 25 (Suppl. 2) (1976) 826-831
- [24] CONSTAM G: Sind die diabetische Angio- und Neuropathie vermeidbar? Med. Klin. 72 (1977) 695-702

- [25] DAY J, THORPE S, BAYNES J: Nonenzymatically Glucosylated Albumin. In vitro preparation and isolation from normal human serum. The J. of Biological Chemistry 254 (1979) 595-597
- [26] DAY J, THORNBURG R; THORPE S, BAYNES J: Nonenzymatically Glucosylated of Rat Albumin. Studies in vitro an din vivo. The J. of Biological Chemistry 254 (1979) 9394-9400
- [27] DEMMEL P: Der Einfluß der Stoffwechselkontrolle auf die Thrombozytenfunktion des Diabetikers. Inaugural-Dissertation, München (1983) 1-83
- [28] DOLAN - HEITLINGER J: Neukombinierte DNA und biosynthetisches Humaninsulin. Eli Lilly and Co. 2. Auflage (1982) 1-64
- [29] DOLHOFFER R, RENNER R, WIELAND O: Different behaviour of haemoglobin A₁ a-c and Glycosyl-Albumin levels during recovery from diabetic ketoacidosis and non-acidotic coma. Diabetologia 21 (1981) 211-215
- [30] DOLHOFFER R, WIELAND O: Increased glycosylation of serum albumin in diabetes mellitus. Diabetes 29 (1980) 417-422
- [31] DOLHOFFER R, WIELAND O: Preparation and biological properties of glycosylated insulin. Febs Letters 100 (1979) 133-136
- [32] DUPUY E, GULLAUSSEAU P, GAUDEUL P, KARTALIS G, WILD A, PASTUREAU A, SORIA C, MALBEC D, DUPREY J, LUBETZKI J, CAEN J: Fonctions plaquettaires des diabétiques ayant une angiopathie. La Nouvelle Press Médicale 8 (1979) 3123-3125

- [33] EJARQUE P, MARBLE A, TULLER E: Proteins, lipoproteins and protein - Bound carbohydrates in the serums of diabetic patients. Am.J.Med. (1959) 221-230

- [34] ELVING L, CASPARIE A, MIEDEMA K, RUSSCHEN C: Plasma β -thromboglobulin in diabetics with and without microangiopathic complications. Diabetologia 21 (1981) 160-161

- [35] ENGERMANN R, BLOODWORTH J, NELSON S: Relationship of microvascular disease in diabetes to metabolic control. Diabetes 26 (1977) 760-769

- [36] EWALD U, KOBBAH M, VESSBY B, TUVEMONT T: Increased platelet aggregability in diabetic children: relations to serum lipid and fatty acid composition. Diabetologia 25 (1983) 382-385

- [37] FERGUSON J, MACKAY N, PHILLIP J; SUMNERD: Determination of platelet and fibrinogen half-life with [^{75}Se] selenomethionine: studies in normal and in diabetic subjects. Clin. Science and Molecular Medicine 49 (1975) 115-120

- [38] FILES J, MALPASS T; YEE E, RITCHIE J, HARKER L: Studies of human platelet α -granule release in vivo. Blood 58 (1981) 607-618

- [39] FINOT P: Nonenzymatic browning products: Physiologic effects and metabolic transit in relation to chemical structure a review. Diabetes 31 (Suppl. 3) (1982) 22-28

- [40] FLÜCKIGER R, WINTERHALTER K: In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c}. Febs Letters 71 (1976) 356-360

- [41] FOX C, DARBY S, IRELAND J, SÖNKSEN P: Blood glucose control and glomerular capillary basement membrane thickening in experimental diabetes. British Medical Journal 2 (1977) 605-605
- [42] FRANK B, CHANCE R: Two routes for producing human insulin utilizing recombinant DNA technology. Münch. Med. Wschr. 125 (Suppl. 1) (1983) 14-19
- [43] FRIEDMAN M: Chemically reactive and unreactive lysine as an index of browning. Diabetes 31 (Suppl. 3) (1982) 5-14
- [44] FRITSCHI J, CHRISTE M, LÄMMLE B, MARBET G; BERGER W, DUCKERT F: Platelet aggregation, β -thromboglobulin and PF 4 in diabetes mellitus and in patients with vasculopathy. Thromb. Haemostas. 52 (1982) 236-239
- [45] GENSINI G, ABBATE R, FAVILLA S, e.a.: Changes of platelet function and blood clotting in diabetes mellitus. Thrombos Haemostas. 42 (1979) 983-993
- [46] GORDON J: Mechanism of platelet - collagen interaction. Nature 278 (1979) 13-14
- [47] GRIES FA: Humaninsulin, ein therapeutischer Fortschritt. Dtsch. Ärzteblatt 79 (1982) 34-35
- [48] HARRISON M, EMMONS P, MITCHELL J: The variability of human platelet aggregation. J. of Artheroscler. Res. 7 (1967) 197-204
- [49] HAWKINS R: Smoking, platelets and thrombosis. Nature 236 (1972) 450-452

- [50] HEATH H, BRIDGEN W; CANEVER J, POLLOCK J, HUNTER P, KELSEY J; BLOOM A: Platelet adhesiveness and aggregation in relation to diabetic retinopathy. *Diabetologia* 7 (1971) 308-315
- [51] HODGE J. Chemistry of browning reactions in model systems. *J. of Agricultural and Food Chemistry* 1 (1953) 928-943
- [52] HOLMQUIST W, SCHRÖDER W: A new N-terminal blocking group involving a Schiff Base in hemoglobin A_{1c}. *Biochemistry* 5 (1966) 2489-2503
- [53] HUISMAN T, DOZY A: Studies on the heterogeneity of hemoglobin with oxidized glutathione. *J. Lab. and Clin. Med.* 60 (1962) 302-319
- [54] INTROZZI P, BERNASCONI C, BUSCARINI L: Serum proteins, lipids and protein-bound carbohydrates in vascular complications of diabetes mellitus. *Acta Medica Scandinavica* 160 (1958) 47-58
- [55] JACKSON C, GREABES M; BOULTON A, e.a.: Near-normal glycaemic control does not correct abnormal platelet reactivity in diabetes mellitus. *Clinical Science* 67 (1984) 551-555
- [56] JAHNKE K, REIS H, HÖHLER H: Konservative Therapie und Prophylaxe der Macroangiopathia Diabetika. *Med. Klin.* 71 (1976) 745-749
- [57] JONES I, OWENS D, WILLIAMS S, RYDER R, e.a.: Glycosylated serum albumin. *Diabetes Care* 6 (1983) 501-503
- [58] JONES R, PETERSON C: Hematologic alterations in diabetes mellitus. *The American J. of Med.* 70 (1981) 339-352

- [59] JONES R, PARADISE C; PETERSON C: Platelet survival in patients with diabetes mellitus. Diabetes 30 (1981) 486-489
- [60] JOHNSON JS: Authenticity and purity of human insulin (recombinant DNA). Diabetes Care 5 Suppl. 2 (1982) 4-9
- [61] KATTLOVE H, ALEXANDER B: The effect of cold on platelets. I. Cold-induced platelet aggregation. Blood 38 (1971) 39-48
- [62] KENNEDY L, BAYNES J: Nonenzymatic glycosylation and the chronic complications of diabetes. Diabetologia 26 (1984) 93-96
- [63] KENNEDY L, MERIMEE T: Glycosylated serum protein and hemoglobin A₁ levels to measure control of glycemia. Ann. Intern. Med. 95 (1981) 56-58
- [64] KERNER W, PFEIFFER EF: Humaninsulin - Herstellung, Wirkung und therapeutische Anwendung. Dtsch. Ärzteblatt 79 (1982) 25-30
- [65] KIM H, KURUP J: Nonenzymatik glycosylation of human plasma low density lipoprotein. Evidence for in vitro and in vivo glycosylation. Metabolism 31 (1982) 348-353
- [66] KUBISZ P, ARABI A, HOLAN J, CONRBERG S: Investigations on platelet function in diabetes mellitus. Haemostasis 14 (1984) 347-353
- [67] LEE T, PINTAURO S, CHICHESTER C: Nutritional and toxicology effects of nonenzymatic maillard browning. Diabetes 31 (Suppl. 3) (1982) 37-46

- [68] LINDER B; GOODMAN D: Studies on the mechanism of the inhibition of platelet aggregation and release induced by high levels of arachidonate. Blood 60 (1982) 436-445
- [69] LÜTJENS A, TE VELDE A, v.d. VEEN E, v.d. MEER J: Glycosylation of human fibrinogen in vivo. Diabetologia 28 (1985) 87-89
- [70] LYONS T, KENNEDY L: Nonenzymatic glycosylation of skin collagen in patients with type I (insulin dependent) diabetes mellitus and limited joint mobility. Diabetologia 28 (1985) 2-5
- [71] MAILLARD L: Action des acides amines sur les sucres: formation des mélanoidines par voie methodique. C. R. Acad. Sci. 154 (1912) 66-68
- [72] MARBLE A: Latecomplications of diabetes. Diabetologia 12 (1976) 193-199
- [73] MARCUS A: Platelet function (first of three parts). The New Engl. J. Med. 280 (1969) 1213-1220
- [74] MARSHALL M: Zur Pathogenese der Arteropathien. Fortschr. Med. 98 (1980) 177-179
- [75] Mc FARLAND K, CATALANO E, DAY J, THORPE S, BAYNES J: Nonenzymatic glucosylation of serum proteins in diabetes mellitus. Diabetes 28 (1979) 1011-1013
- [76] Mc MILLAN D: Changes in serum proteins and protein - bound carbohydrates in diabetes mellitus. Diabetologia 6 (1970) 597-604

- [77] MEANS G, CHANG M: Nonenzymatic glycosylation of proteins structure and function changes. Diabetes 31 (Suppl. 3) (1982) 1-4
- [78] MILLER J, GRAVALLESE E, NUNN H: Nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins. J. Clin. Invest. 65 (1979) 896-991
- [79] MIROUZE J, MONNIER L, RICHARD JL, GACEL A, SOUA KB: Comparative study of NPH human insulin (recombinant DNA) and pork insulin in diabetic subjects: Preliminary report: Diabetes Care 5, Suppl. 2 (1982) 60-62
- [80] MONCADA S, VANE J: Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood - vessel walls. The New Engl. J. Med. 300 (1979) 1142-1147
- [81] MONNIER V, CERAMI A: Nonenzymatic glycosylation and browning in diabetes and aging. Diabetes 31 (Suppl. 3) (1982) 57-63
- [82] O'HARE J, TWOMEY B, FERRIS J, O'SULLIVAN D: Metabolic control, hyperzension and microvascular complications independently affect transcapilliary escape of albumin in diabetes. Diabetologia 22 (1982) 391-392
- [83] PACKHAM M. Standardization of collagen: consideration of current practices in testing collagen-induced aggregation. Thromb. Haemostas. 52 (1984) 358-361
- [84] PATTON A, HILL E: Inactivation of nutrients heating with glucose. Science 107 (1948) 68-69

- [[85] PAULSEN E, Mc CLUNG N, SABIO H: Some characteristics of spontaneous platelet aggregation in young insulin-dependant diabetic subjects. *Hormone and Metabolic Research* (Suppl. 11) (1981) 15-21
- [86] PEERSCHKE E, ZUCKER M, GRANT R, EGAN J: Correlation between fibrinogen binding to human platelets and platelet aggregability. *Blood* 55 (1980) 841-847
- [87] PEERSCHKE E, ZUCKER M. Fibrinogen receptor exposure and aggregation of human blood platelets produced by ADP and chilling. *Blood* 57 (1981) 663-670
- [88] PENSE E, PANZRAM G, PISSAREK D, MEINHOLD J, e.a.: Qualität der Stoffwechselführung und Angiopathie bei 180 Langzeitdiabetikern mit mindestens 20-jähriger Krankheitsdauer. *Schweiz. Med. Wschr.* 103 (1973) 1125-1129
- [89] PETIT L: La réaction de Maillard dans les industries de l'alimentation. *Industr. alim. agr.* 81 (1964) 905-914
- [90] PORTA M, HILGARD P, KOHNER E: Platelet shape change abnormalities in diabetic retinopathy. *Diabetologia* 18 (1980) 217-221
- [91] PORTA M: Availability of endothelial von Willebrand factor and platelet function in diabetic patients infused with a vasespressin analogue. *Diabetologia* 23 (1982) 452-455
- [92] PRESTON F, MARCOLA B, WARD J, PORTER N, TIMPERLEY W: Elevated B-thromboglobulin levels and circulating platelet aggregates in diabetic microangiopathie. *The Lancet* I (1978) 238-240
- 93] PUTNAM F: The plasma proteins. Structure, function and genetic control. Academic Press New York, San Francisco, London (1975), 2nd edition, p. 133-156

- [94] RASKIN P: Diabetic regulation and its relationship to microangiopathy. *Metabolism* 27 (1978) 235-252
- [95] RASKIN P, PIETRI A, UNGER R, SHANNON W: The effect of diabetic control on the width of skeletal-muscle capillary basement membrane in patients with typ I diabetes mellitus. *The New Engl. J. Med.* 309 (1983) 1546-1551
- [96] ROBINS S, BAILEY A: Age-related changes in collagen: The identification of reducible lysine-carbohydrate condensation products. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 48 (1972) 76-84
- [97] ROSS R, GLOMSET J: The Pathogenesis of arteriosclereosis:
Teil I: *New Engl. J. Med.* 295 (1976) 369-377
Teil II: *New Engl. J. Med.* 295 (1976) 420-425
- [98] SAGEL J, COLWELL J, CROOK L, LAIMINS M: Increased platelet aggregation in early diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine* 82 (1975) 733-738
- [99] SALTSMARCH M, LABUZA T: Nonenzymatic browning via the maillard reaction in foods. *Diabetes* 31 (Suppl. 3) (1982) 29-36
- [100] SCHAFER A, HANDIN R: The role of platelets in thrombotic and vascular disease. *Progress in cardiovascular diseases* 22 (1979) 31-52
- [101] SCHARF R, SCHNEIDER W: Die Rolle der Blutplättchen bei Mikrozirkulationsstörungen. *Dtsch. Med. Wschr.* 109 (1984) 306-313

- [102] SCHLEICHER E, SCHELLER L, WIELAND O: Quantitation of lysine-bound glucose of normal and diabetic erythrocyte membranes by HPLC analysis of furosine. Biochem. Biophys. Res. Com 99 (1981) 1011-1019
- [103] SCHLÜTER K, KERP L. Hormonelle Gegenregulation nach Humaninsulin und Schweineinsulin. Münchn. Med. Wschr. 125 (Suppl. 1) (1983) 116-120
- [104] SCHÖFFLING K, ROSAK C, FASSBINDER W, ALTHOFF P: Einfluß von biosynthetischem Humaninsulin und hochgereinigtem Schweineinsulin auf den Intermediärstoffwechsel und die hormonelle Gegenregulation beim Menschen. Münchn. Med. Wschr. 125 (Suppl. 1) (1983) 26-32
- [105] SIESS W, ROTH P, WEBER P: Stimulated platelet aggregation, thromboxane B₂ formation and platelet sensitivity to prostacyclin. Thrombos. Haemostas (Stuttgart) 45 (1981) 204-207
- [106] SONNENBERG GE, BERGER M: Humaninsulin ein therapeutischer Fortschritt? Dtsch. Med. Wschr, 108 (1983) 927-931
- [107] SPIRO R: Search for a biochemical basis of diabetic microangiopathy. Diabetologica 12 (1976) 1-14
- [108] STEEN V, HOLMSEN H: Inhibition of ADP-induced responses in human platelets by agents elevating the cyclic AMP level: Comparison of aggregation and shape change. Thromb. Haemostas. 52 (1984) 333-335
- [109] STEVENS V, ROUZER C, MONNIER V, CERAMI A: Diabetic cataract formation: potential role of glycosylation of lens crystallins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 2918-2922

- [110] TCHOBROUTZKY G: Relation of diabetic control to development of microvascular complications. *Diabetologia* 15 (1978) 143-152
- [111] WARLOW C, CORINA A, OGSTON D, DOUGLAS A: The relationship between platelet aggregation and time interval after venepuncture. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 31 (1974) 133-141
- [112] WEISS H. Platelet physiology and abnormalities of platelet function. *The New Engl. J. Med.* 293 (1975) 531-541
- [113] WENCEL - DRAKE J, FEINBERG H: ADP-induced depolarization of human platelet membran potential. *Thromb. Haemostas.* 53 (1985) 75-79
- [114] WILLIAMS S, DEVENNY J, BITENSKY M: Micropinocytic ingestion of glycosylated albumin by isolated microvessels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 2393-2397
- [115] WILLMS B: Einfluß der Stoffwechselkontrolle auf die Entwicklung von Spätkomplikationen des Diabetes. *Münchn. Med. Wschr.* 119 (1977) 482-488
- [116] WITZTUM I, MAHONEY E, BRANKS M, FISCHER M, ELAM R, STEINBERG G: Nonenzymatic glycolysation of low-density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes* 31 (1982) 283-291

LEBENS LAUF

19.10.1955	geboren in Nürnberg als zweites Kind des Architekten Martin Bock und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Sondermann
1962 - 1966	Besuch der Grundschule in Nürnberg
1966 - 1976	Besuch des humanistischen Melanchthon-Gymnasiums Nürnberg bis 1970, dann Wechsel an das musische Christian-Ernst-Gymnasium Erlangen
Aug. 76 - April 77	Krankenpflegeausbildung an den Rummelsberger Anstalten
Mai 1977	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Erlangen-Nürnberg
20.3.1979	Physikum
Mai 1980	Wechsel an die Technische Universität München
21.8.1980	Erstes Staatsexamen
Aug. 1981	Famulatur auf der Innerern Abteilung des Städtischen Krankenhauses Bad Tölz
Mai 1982	Famulatur auf der Inneren Abteilung der Krankenanstalten Rummelsberg
Sept. - Okt. 1982	Famulatur in einer Fachpraxis für Lungenkrankheiten
18.3.1983	Zweites Staatsexamen
Mai 83 - Juli 84	Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Montpellier in Frankreich
Oktober 1984	Drittes Staatsexamen
August 1985	Seit 1.8.1985 Chirurgischer Assistenzarzt im St. Vincenz-Krankenhaus Paderborn

Herrn Prof. R. Landgraf danke ich für die Überlassung des Themas, die wertvollen Anregungen und die Korrektur der Arbeit. Herrn Prof. E. Buchborn danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Frau Dr. M.M.C. Landgraf-Leurs danke ich für die rege Unterstützung und stets hilfreiche Kritik an der Arbeit.

Meiner Kollegin Frau Barbara Smolka, mit der ich den methodischen Teil dieser Arbeit gemeinsam erarbeitet habe, danke ich besonders für die kollegiale Zusammenarbeit.

Die konstruktive Unterstützung und technische Assistenz von Frl. S. Kammerer verdient besondere Anerkennung.

